



Facoltà di Medicina e Chirurgia

**DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA DELLO
SVILUPPO SESSUALE**

XIX CICLO

Coordinatore: Prof. Gian Paolo Salvioli

**STUDIO MOLECOLARE IN PAZIENTI CON
IPERPLASIA SURRENALE CONGENITA**

Tesi di Dottorato

**Dottoranda:
D.ssa
Soara Menabò**

**Relatore:
Chiar.mo Prof.
Alessandro Cicognani**

**Correlatore:
D.ssa
Lilia Baldazzi**

INDICE

INTRODUZIONE GENERALE	2
SINTESI e REGOLAZIONE DEGLI STEROIDI NEL SURRENE	5
L' IPERPLASIA SURRENALE CONGENITA	8
DEFICIT DI 21-IDROSSILASI E DI 11 β -IDROSSILASI	10
FENOTIPI	11
DIAGNOSI DIFFERENZIALE	14
CYP21A2	15
STRUTTURA DEL LOCUS GENICO	15
IL GENE <i>CYP21A2</i>	16
L'ESPRESSIONE	17
LA PROTEINA	18
LE MUTAZIONI	19
CYP11B1	23
LA PROTEINA	23
IL GENE <i>CYP11B1</i>	24
LE MUTAZIONI	25
CORRELAZIONE GENOTIPO-FENOTIPO	26
"MANAGEMENT" DEI PAZIENTI E DIAGNOSI PRENATALE	30
OBIETTIVI DEL PROGETTO	33
PAZIENTI	35
MATERIALI E METODI	39
ESTRAZIONE DEL DNA	39
AMPLIFICAZIONE SPECIFICA DEL GENE <i>CYP21A2</i>	39
AMPLIFICAZIONE SPECIFICA DEL GENE <i>CYP11B1</i>	42
PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI PCR	43
SEQUENZIAMENTO DIRETTO	43
MICROSATELLITI	45
STUDI FUNZIONALI	46
PREPARAZIONE VETTORI	47
TRASFEZIONE	48
ESTRAZIONE RNA TOTALE	49
RETROTRASCRIZIONE	49
REAL-TIME PCR	50
WESTERN BLOT	51
RISULTATI	53
DISCUSSIONE	66
CONCLUSIONI	70
BIBLIOGRAFIA	72

INTRODUZIONE GENERALE

Nell'uomo lo sviluppo sessuale è un processo lungo e complesso che inizia nell'embrione e ha termine con l'adolescenza, pertanto con il termine "patologie dello sviluppo sessuale" si può intendere una qualsiasi alterazione che interrompa o modifichi questa serie di eventi. Il normale sviluppo sessuale si può dividere in due tappe: la determinazione sessuale e il differenziamento sessuale. Con **determinazione sessuale** s'intende la formazione delle gonadi (ovaio e testicolo). Tale processo dipende dall'assetto cromosomico dell'embrione ed è determinato da molteplici eventi che dirigono lo sviluppo delle cellule germinali, la loro migrazione nel seno urogenitale portando alla formazione di una gonade bipotente e la successiva formazione del testicolo in presenza del cromosoma Y, o dell'ovaio in assenza dell'Y e in presenza di un secondo cromosoma X (46, XX).

Con **differenziamento sessuale** si intende la formazione dei genitali esterni ed interni. Questo processo dipende dalla risposta sesso-specifica dei tessuti alla produzione di ormoni da parte delle gonadi dopo la loro differenziazione in senso maschile o femminile. Nel feto, alla settima settimana, sono presenti sia i dotti di Wolff, sia i dotti di Müller che rappresentano rispettivamente i primordi di quello che saranno i genitali interni maschili (epididimi, vasi deferenti, vescicole seminali e dotti eiaculatori) e femminili (tube uterine, utero, collo uterino e terzo superiore della vagina). Nei maschi in seguito alla produzione da parte del testicolo dell'ormone antimulleriano e del testosterone, i dotti di Müller regrediscono e i dotti di Wolff si differenziano. Nelle femmine in assenza dell'ormone antimulleriano i dotti di Müller si differenziano e i dotti di Wolff, senza stimolazione del testosterone, regrediscono.

Anche i genitali esterni all'inizio della gestazione sono bipotenti. Alla settima-ottava settimana, se c'è una sufficiente produzione di deidrotestosterone e se il feto è in grado di rispondere correttamente agli androgeni, il tubercolo genitale si sviluppa in senso maschile dando origine al pene, si ha la fusione delle pieghe uretrali e la discesa dei rigonfiamenti labioscrotali che formeranno parte del pene e lo scroto. In assenza di stimoli androgenici il tubercolo genitale si sviluppa in clitoride, le pieghe uretrali nelle piccole labbra, i rigonfiamenti labioscrotali nelle grandi labbra.

Il fenotipo sessuale si modifica ulteriormente durante la pubertà, arrivando ad una completa maturazione e al raggiungimento del potenziale riproduttivo.

La formazione dell'apparato genitale è quindi il risultato di una serie d'eventi controllati dall'interazione altamente coordinata di fattori ormonali e genetici.

Quando si verificano patologie del differenziamento sessuale, uno di questi fattori non ha agito in maniera qualitativamente o quantitativamente corretta.

Le patologie del differenziamento sessuale si riconoscono spesso alla nascita per la presenza nel neonato di genitali esterni ambigui e possono essere di tipo ereditario autosomico recessivo, X-linked, Y-linked o multifattoriale. In figura 1, insieme alla rappresentazione della normale formazione dei genitali esterni, sono schematizzati i diversi difetti molecolari, conosciuti, che causano patologie del differenziamento sessuale con possibile formazione di genitali ambigui. La causa più comune d'ambiguità genitale è la forma virilizzante dell'**iperplasia surrenale congenita**, che nel 90% dei casi è causata dal **deficit di 21-idrossilasi** e nel 5-8% dei casi dal **deficit di 11 β -idrossilasi (OMIM)**.

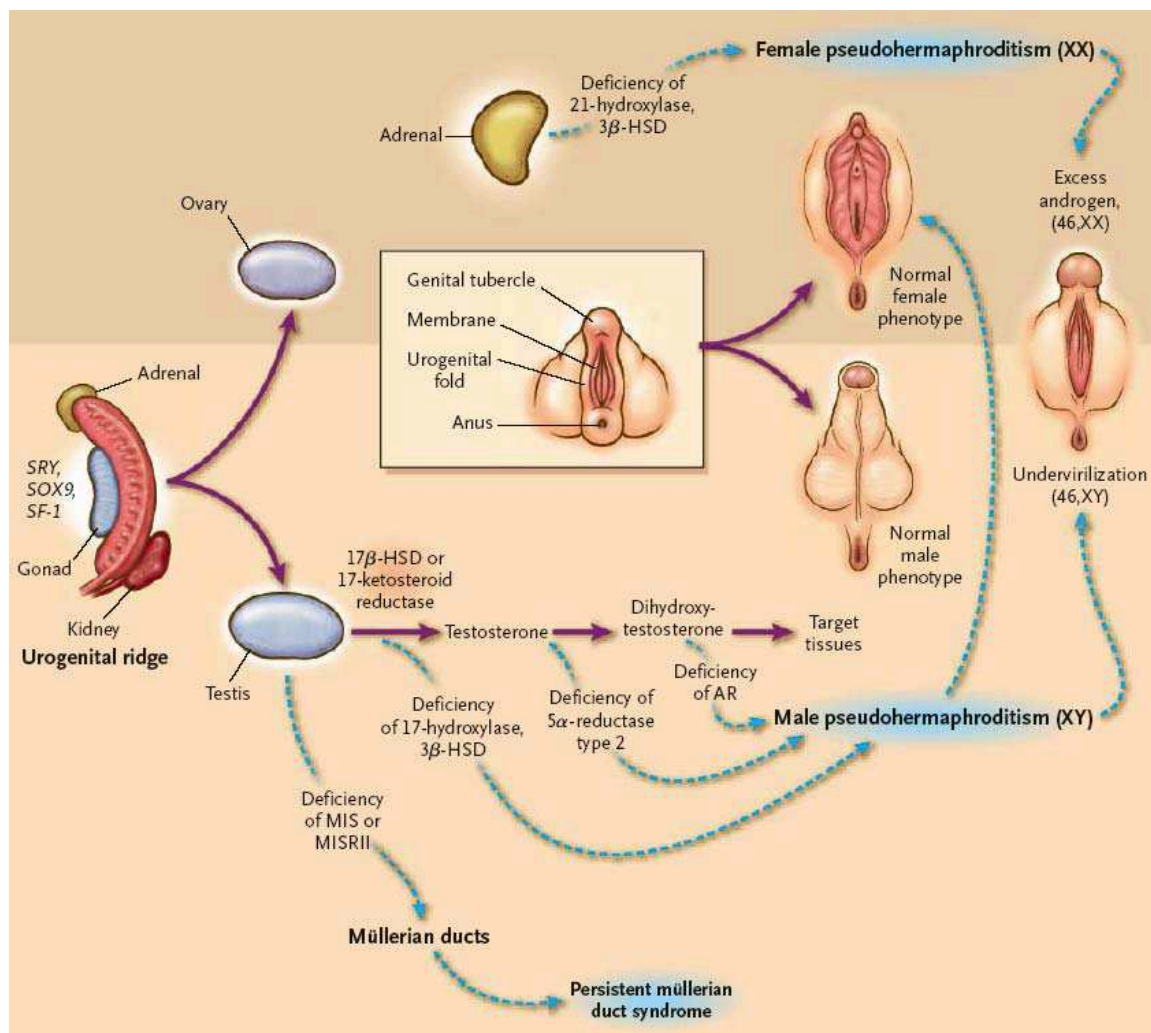


Figura 1. Schema del normale differenziamento dei genitali esterni e dei diversi difetti molecolari, a livello della sintesi o azione degli ormoni, che causano patologie del differenziamento sessuale, dopo la formazione delle gonadi. HSD sta per idrossisteroide deidrogenasi; MIS, ormone antimülleriano; MISRII, recettore di tipo II per l'ormone antimülleriano; AR, recettore degli androgeni; *SF-1*, gene per il fattore steroidogenico 1; *SRY*, gene per la sex-determining region nel cromosoma Y; *SOX9*, gene per SRY homeobox 9.

SINTESI e REGOLAZIONE DEGLI STEROIDI NEL SURRENE

Gli ormoni steroidei sono prodotti dalla corteccia surrenale e si possono dividere in tre principali categorie: i mineralcorticoidi (aldosterone), prodotti nella zona glomerulosa, i glucocorticoidi (cortisolo) e gli androgeni (testosterone), prodotti nella zona fascicolata e reticolare. Il precursore comune è il colesterolo che viene trasformato da una serie di reazioni interconnesse, catalizzate da diversi enzimi che appartengono alla superfamiglia dei citocromi P450 (CYP11A1, CYP21A2, CYP17, CYP11B2, CYP11B1), tranne uno, la 3 β -idrossisteroidodeidrogenasi (3 β -HSD).

La fonte più immediata di colesterolo è rappresentata dalle goccioline lipidiche contenute nelle cellule corticali, nelle quali il colesterolo trasportato nel sangue dalle LDL (lipoproteine a bassa densità) viene accumulato sotto forma di esteri e rilasciato al bisogno per azione della colesterolo esterasi. La corteccia della ghiandola surrenale è in grado inoltre di sintetizzare il colesterolo de novo a partire dall'acetato e la tappa limitante di tale processo è controllata dall'enzima HMG-CoA reduttasi.

La via di sintesi degli ormoni steroidei comincia con il trasporto del colesterolo a livello del mitocondrio e la sua trasformazione in pregnenolone mediante taglio della catena laterale (fig. 2). Tale reazione, tappa limitante di tutta la via di sintesi, è catalizzata dall'enzima CYP11A1 (o P450_{ssc}).

La sintesi dei glucocorticoidi nelle zona reticolare e fascicolata è stimolata dall'ormone adrenocorticotropo (ACTH) (Bornstein SR et al, 1999) prodotto dall'ipofisi anteriore sotto lo stimolo ipotalamico del Corticotropine Releasing Hormone (CRH). L'ACTH stimola l'attività dell'enzima CYP11A1 e l'espressione dei geni che codificano per l'esterasi, per l'HMG-CoA reduttasi e per i diversi enzimi coinvolti nella steroidogenesi. La secrezione di ACTH è inibita con un

meccanismo a feed back negativo dall'aumento della concentrazione ematica dei glucocorticoidi che agiscono sia a livello dell'ipotalamo sia delle cellule corticotrope. L'ACTH ha anche un'azione trofica sulle cellule della zona fascicolata e di quella glomerulare del surrene mantenendone le dimensioni e l'integrità funzionale. Il CRH è il maggiore fattore di regolazione della secrezione di ACTH, ma anche altre sostanze possono modularne la secrezione. L'Arginina Vasopressina (AVP), che è un debole induttore di secrezione di per sé, potenzia marcatamente gli effetti del CRH sulle cellule corticotrope per la secrezione dell'ACTH. Condizioni di stress come l'ipoglicemia insulino-indotta e la febbre pirogena sembrano agire direttamente sulla secrezione di ACTH. In condizioni normali l'ACTH è secreto in maniera pulsatile 8-10 volte al giorno.

Il maggiore sistema di regolazione della sintesi dei mineralcorticoidi, nella zona glomerulosa è il sistema renina-angiotensina (Rainey WE, 1998). Il mediatore effettivo è l'angiotensina II che stimola la sintesi dell'aldosterone favorendo il passaggio del colesterolo attraverso la membrana mitocondriale e la sua conversione in pregnenolone.

La secrezione dell'aldosterone viene stimolata anche, per un effetto diretto sulle cellule della zona glomerulosa, da un aumento della concentrazione del potassio nei liquidi extracellulari. L'aldosterone stimola il riassorbimento renale del sodio e l'escrezione del potassio e degli ioni idrogeno, contribuendo al mantenimento dell'omeostasi dei liquidi corporei.

Il controllo della sintesi degli androgeni è invece un processo meno conosciuto. Il principale ormone prodotto in entrambi i sessi è il diidroepiandrostenedione (DHEA), come tale o come solfato (DHEAS). Nelle donne adulte gli androgeni surrenalici contribuiscono alla formazione del 75% del testosterone presente in circolo, mentre negli uomini hanno uno scarso significato biologico perché si aggiungono agli androgeni d'origine testicolare. Fatta eccezione per il ruolo

giocato nei processi di sviluppo che precedono la pubertà in entrambi i sessi, gli androgeni surrenalici, essendo dotati di debole attività mascolinizante, esercitano una scarsa influenza fisiologica. Dall'osservazione clinica si è dimostrato che la secrezione degli androgeni e dei glucocorticoidi non è accoppiata. Durante l'infanzia infatti non ci sono quantitativi rilevabili di androgeni nel plasma, ma il loro livello aumenta marcatamente alla pubertà senza che ci siano cambiamenti nella secrezione di ACTH o cortisolo. E' stato suggerito che ci sia un regolatore specifico a livello dell'ipofisi anteriore, mentre altri sostengono che i cofattori enzimatici possano influenzare i diversi tipi d'attività degli enzimi.

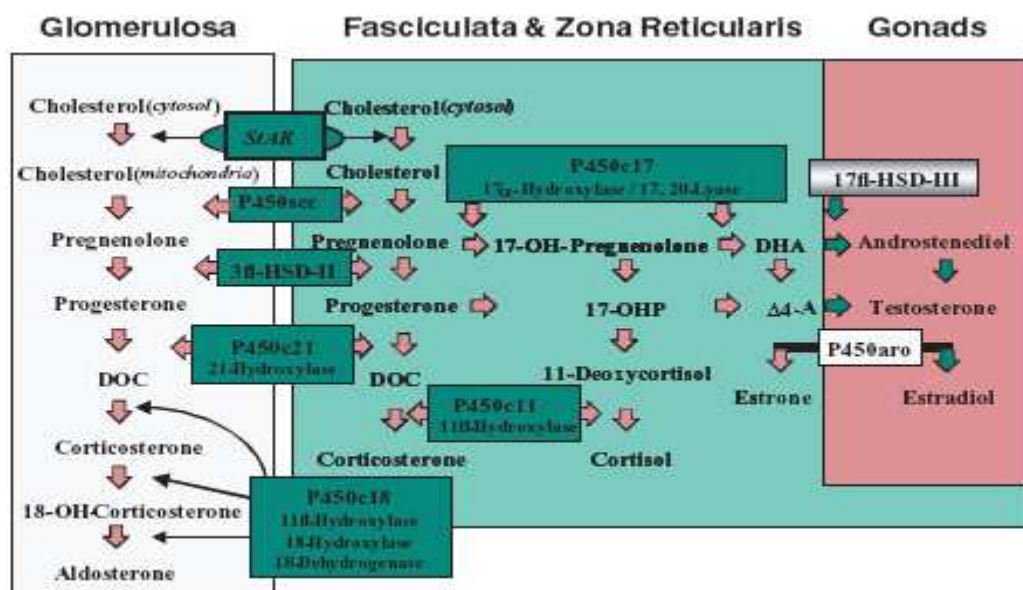


Figura 2. Schema della via di sintesi degli steroidi con indicazione degli enzimi coinvolti (da Forest MG et al, 2004).

L' IPERPLASIA SURRENALE CONGENITA

L'iperplasia surrenale congenita rappresenta una famiglia di patologie causate da errori della steroidogenesi, ognuna caratterizzata da uno specifico deficit enzimatico che altera la produzione di cortisolo nella corteccia surrenale e può portare ad ambiguità sessuale. Gli enzimi più comunemente coinvolti sono 21-idrossilasi, 11 β -idrossilasi, P450 ossidoreduttasi e 3 β -idrossisteroidodeidrogenasi, e in misura minore, 17 α -idrossilasi/17,20-liasi e colesterolo desolasi (New MI, 2003). Un difetto in questi enzimi causa una diminuzione di produzione di cortisolo che risulta in un aumento della secrezione ipofisaria di ACTH. Pertanto la concentrazione ematica di ACTH risulta costantemente superiore alla norma mantenendo la corteccia sovrastimolata ed esitando nell'ipertrofia della ghiandola surrenale. Inoltre, l'aumento di ACTH causa un accumulo di precursori steroidei che vengono deviati verso le vie normalmente funzionanti portando ad un aumento di produzione degli altri ormoni. La corretta identificazione dell'enzima coinvolto è possibile grazie ai dati clinici che riflettono i diversi pattern ormonali.

In questa tesi verranno trattati in modo specifico il deficit di 21-idrossilasi e di 11 β -idrossilasi, responsabili rispettivamente del 90% e del 5-8% dei casi di iperplasia surrenale congenita (OMIM).

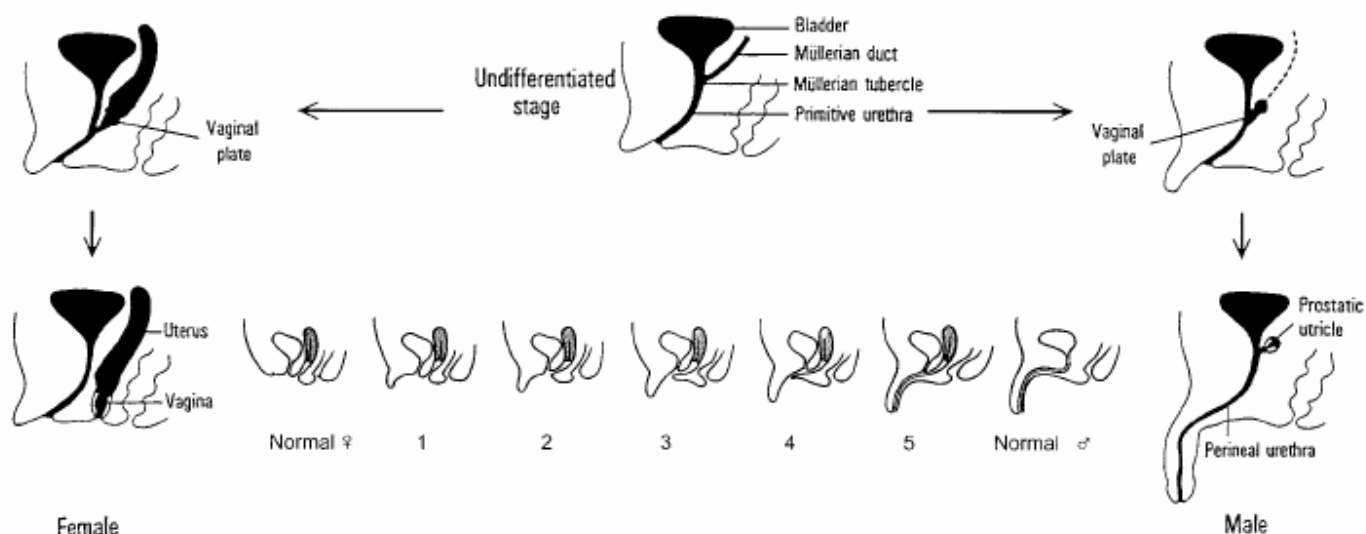


Figura 3. Differenziamento del seno urogenitale e dei genitali esterni. In alto e ai lati diagrammi della normale anatomia femminile e maschile, in basso una serie di rappresentazioni schematiche di diversi gradi di virilizzazione femminile. I numeri indicano i gradi di virilizzazione secondo la scala sviluppata da Prader (Prader A, 1958). *Da White et al., 2000.*

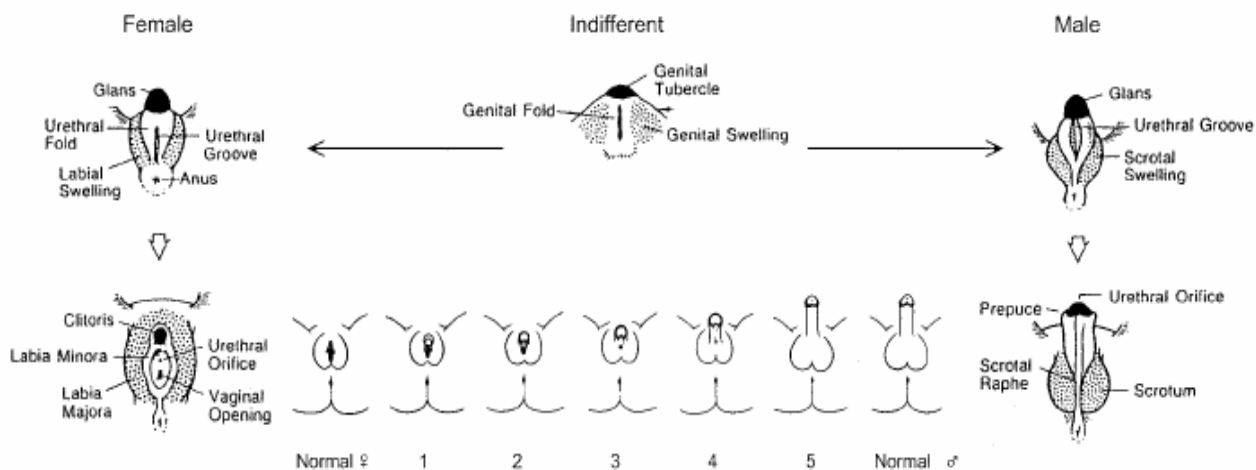


Figura 4. Differenziamento dei genitali esterni. In alto e ai lati diagrammi della normale anatomia femminile e maschile, in basso una serie di rappresentazioni schematiche di diversi gradi di virilizzazione femminile. I numeri indicano i gradi di virilizzazione secondo la scala sviluppata da Prader (Prader A, 1958). *Da White et al. 2000*

DEFICIT DI 21-IDROSSILASI E DI 11 β -IDROSSILASI

Nel deficit di 21-idrossilasi la frequenza della malattia in Italia è stimata a 1/14.000 per la forma classica e 1/5000 per la forma lieve (dato sottostimato per il numero elevato di diagnosi mancate in alcune regioni). La frequenza dei portatori eterozigoti è stimata 1/62.

La frequenza del deficit di 11 β -idrossilasi nel mondo è stimata a 1/100.000. Moltissimi casi riguardano soggetti di origine ebrea marocchina in cui l'incidenza è stimata a 1/5.000-1/7.000 (Rosler A et al, 1992).

L'enzima 21-idrossilasi è responsabile della conversione del progesterone in deossicorticosterone e del 17-idrossiprogesterone in 11-deossicortisolo: interviene pertanto nella via di sintesi sia del cortisolo che dell'aldosterone. Quest'ultimo viene normalmente prodotto in misura 100-1000 volte minore rispetto al cortisolo, per cui è sufficiente una minima attività dell'enzima per salvare questa via di sintesi. L'enzima 11 β -idrossilasi (CYP11B1) interviene invece nella tappa successiva ed è responsabile della conversione dell'11-deossicortisolo in cortisolo e del deossicorticosterone in corticosterone. Quest'ultima reazione di idrossilazione però può essere svolta anche da un altro enzima, CYP11B2, che è in grado di catalizzare tutte e tre le reazioni che portano dal deossicorticosterone all'aldosterone (White PC et al, 1994).

In entrambi i deficit si ha accumulo dei precursori che vengono in parte escreti con le urine sotto forma di tetraidro-metaboliti e in parte deviati verso la via di sintesi degli androgeni a causa dell'interconnessione a più livelli delle vie di sintesi degli steroidi (fig.2).

Le caratteristiche principali e comuni di questi due tipi di deficit sono la diminuita produzione di cortisolo e l'iperproduzione d'androgeni surrenalici. L'eccesso d'androgeni causa la caratteristica principale della iperplasia

surrenale congenita: l'**androgenizzazione**. Si manifesta con macrogenitosomia o pseudopubertà precoce nei maschi e, nei casi gravi, con ambiguità dei genitali nei neonati di sesso femminile, il cui grado di virilizzazione può variare da un'isolata clitoridomegalia ad un aspetto completamente mascolino dei genitali (fig. 3 e 4). In entrambi i sessi inoltre l'iperproduzione degli androgeni comporta un'accelerazione della maturazione ossea, con rapido sviluppo dei nuclei epifisari che esita in una rilevante diminuzione della statura definitiva. Altre manifestazioni possono essere: precoce comparsa di pelosità pubica, acne, eccessivo sviluppo muscolare ed iperpigmentazione particolarmente nella regione genitale.

FENOTIPI

DEFICIT DI 21-IDROSSILASI

La malattia si presenta con un continuum di manifestazioni cliniche che dipendono dalla gravità del deficit enzimatico. Per comodità clinica la malattia viene distinta in due forme: la forma classica causata da un deficit enzimatico grave e con insorgenza precoce e la forma non classica o ad insorgenza tardiva in cui il deficit è minore. La forma classica (CL) si differenzia a sua volta nella forma con perdita di sali, quando il deficit è totale e nella forma definita virilizzazione semplice quando c'è un quantitativo minimo d'enzima sufficiente per produrre l'aldosterone.

La forma con perdita di sali (SW, salt wasting) è la forma più grave, dovuta all'assenza di sintesi di cortisolo e di aldosterone concomitante ad una eccessiva sintesi di androgeni. Il paziente presenta una crisi surrenale acuta, solitamente tra il quarto ed il quindicesimo giorno di vita; a volte anche tardivamente tra la sesta e la dodicesima settimana di vita. La mancanza di

aldosterone porta ad iponatriemia, iperkaliemia, acidosi, ipotensione, shock, collasso cardiocircolatorio, nonché alla morte se non viene tempestivamente instaurata una terapia sostitutiva oltre che sintomatica. Le femmine affette sono riconosciute per la virilizzazione quasi completa dei genitali esterni che sembrano quelli di un maschio normale, eccetto che per l'assenza di gonadi alla palpazione del sacco scrotale. Nei maschi la diagnosi è più difficile perché i sintomi possono essere confusi con quelli della stenosi del piloro. La diagnosi differenziale viene fatta mediante controllo del pattern elettrolitico.

Nella forma "virilizzazione semplice" (SV, simple virilizing) la quantità minima d'enzima presente viene utilizzata dalla via dell'aldosterone. Data l'iperstimolazione della via di sintesi degli steroidi l'aldosterone riesce ad essere prodotto in un quantitativo sufficiente, almeno in condizioni normali, per la sua funzione fisiologica. I sintomi dell'androgenizzazione sono sempre molto evidenti. Questa forma si riconosce quasi subito nelle bambine per l'ambiguità dei genitali, mentre nei maschi viene diagnosticata in un periodo che va dal sesto mese di vita agli otto anni circa, per la comparsa di un'eccessiva peluria. L'altezza negli individui affetti non correttamente curati è seriamente compromessa tra 140-150 cm circa nelle femmine e 145-155 cm nei maschi.

La forma lieve o non classica (NC), o ad esordio tardivo non viene diagnosticata alla nascita perché non causa virilizzazione dei genitali esterni nelle femmine, ma l'effetto dell'eccessiva produzione d'androgeni si nota alla pubertà quando compaiono sintomi quali irsutismo, amenorrea, cisti ovariche e diminuzione della fertilità. I maschi spesso sfuggono alla diagnosi e possono essere riconosciuti a seguito dell'elevata produzione di 17-OHP in risposta alla somministrazione d'ACTH. I soggetti che non manifestano segni clinicamente evidenti sono detti criptici.

Conoscere il grado di severità della malattia, non solo clinicamente ma anche da un punto di vista molecolare, è importante per ottimizzare e personalizzare il trattamento terapeutico.

DEFICIT DI 11B-IDROSSILASI

Anche in questo caso si distinguono due forme, classica e non classica.

La forma classica è caratterizzata dalla presenza di androgenizzazione importante e si manifesta con le stesse caratteristiche già descritte per la forma classica del deficit di 21-idrossilasi. Inoltre circa 2/3 dei pazienti affetti da forma classica presentano ipertensione di media o elevata gravità che si manifesta nei primi anni di vita.

In circa 1/3 dei pazienti ipertesi è stata osservata ipertrofia del ventricolo sinistro e/o retinopatia e sono riportati casi di morte per attacchi cerebrovascolari. Sono stati descritti anche altri sintomi da eccesso di mineralcorticoidi come ipokalemia, debolezza muscolare o crampi.

La causa dell'ipertensione nel deficit di 11 β -idrossilasi non è ben chiara, probabilmente è dovuta all'azione mineralcorticoide di alcuni metaboliti del deossicorticosterone.

Anche se l'ipertensione è il sintomo caratteristico del deficit di 11B-idrossilasi, ci sono pazienti che manifestano segni di deficit di mineralcorticoidi come ipokalemia, iponatremia e ipovolemia. A volte ciò è aggravato dalla terapia con glucocorticoidi, probabilmente perché la brusca diminuzione di deossicorticosterone disponibile non viene subito compensata con un adeguato aumento di produzione di aldosterone. In alcuni casi invece il deficit di mineralcorticoidi è presente anche prima del trattamento. Non è ancora chiaro il meccanismo in quanto l'enzima CYP11B2 dovrebbe provvedere ugualmente alla normale produzione di aldosterone.

I pazienti con forma non classica hanno la stessa presentazione clinica dei pazienti con forma non classica per deficit di 21-OH e hanno pressione normale o solo lievemente elevata.

I soggetti portatori di deficit di 11 β -OH non mostrano livelli alterati di ormoni nè basali, nè dopo stimolo con ACTH (White PC et al,1994).

DIAGNOSI DIFFERENZIALE

Considerato che le due patologie si manifestano praticamente con gli stessi sintomi, la distinzione tra i due deficit si basa sui valori ormonali e sull'indagine genetica. In entrambi i casi si hanno valori bassi di cortisolo e valori elevati di androgeni, correlati alla gravità della patologia.

Nel caso di deficit di 21-idrossilasi si ha un aumento dei livelli di 17-idrossiprogesterone (17-OHP) sia basale che dopo stimolo con ACTH, proporzionali al grado di deficit enzimatico.

Nel deficit di 11 β -OH si ha invece un innalzamento dei livelli, basali e dopo stimolo, di 11-deossicortisolo e di 11-deossicorticosterone. A volte può essere elevato solo uno dei due valori e si può avere anche un innalzamento del 17-OHP che può portare a una errata diagnosi se non si controllano anche gli altri ormoni.

Si può anche valutare la secrezione dei metaboliti nelle urine.

CYP21A2

STRUTTURA DEL LOCUS GENICO

Il locus della 21 idrossilasi si trova nella regione 6p21.3, all'interno della regione di classe III del complesso maggiore d'istocompatibilità (MHC). La struttura del locus è resa complessa dalla presenza, vicino al gene normale (*CYP21A2*, *CYP21* o *CYP21B*), dello pseudogene inattivo (*CYP21A2P*, *CYP21P* o *CYP21A*). Il gene *CYP21A2* e lo pseudogene si trovano alternati ai geni *C4B* e *C4A* che codificano per il componente 4 del complemento (White PC et al, 1985). I geni *CYP21* e *C4* fanno inoltre parte del modulo ripetuto RCCX (figura 5). Tale modulo è lungo 32,7 o 26,4 Kb e contiene una parte del gene *RP*, un intero gene *C4*, (con o senza l'inserzione di una sequenza retrovirale nell'introne 9) (Dangel AW et al, 1994), un intero gene *CYP21(P)*, e parte del gene *TNX*. Tale modulo viene ripetuto come un'unità genetica discreta (Yang Z et al, 1999).

Nella popolazione caucasica il modulo è stato trovato in 3 forme, monomodulare, bimodulare e trimodulare (Lee HH, 2005). La forma bimodulare è la più frequente. Il gene *RP1* codifica per una serina/treonina kinasi, il gene *RP2* ne rappresenta una copia troncata. Il gene *TNXB* codifica una proteina della matrice extracellulare, la tenascina X, il *TNXA* rappresenta una copia troncata. I geni *RP*, *C4* e *CYP* sono trascritti nella stessa direzione, mentre i geni *TNX* hanno orientamento opposto, inoltre le regioni 3' terminali dei *CYP21* e *TNX* si sovrappongono di 444 bp (Yang Z et al, 1999).

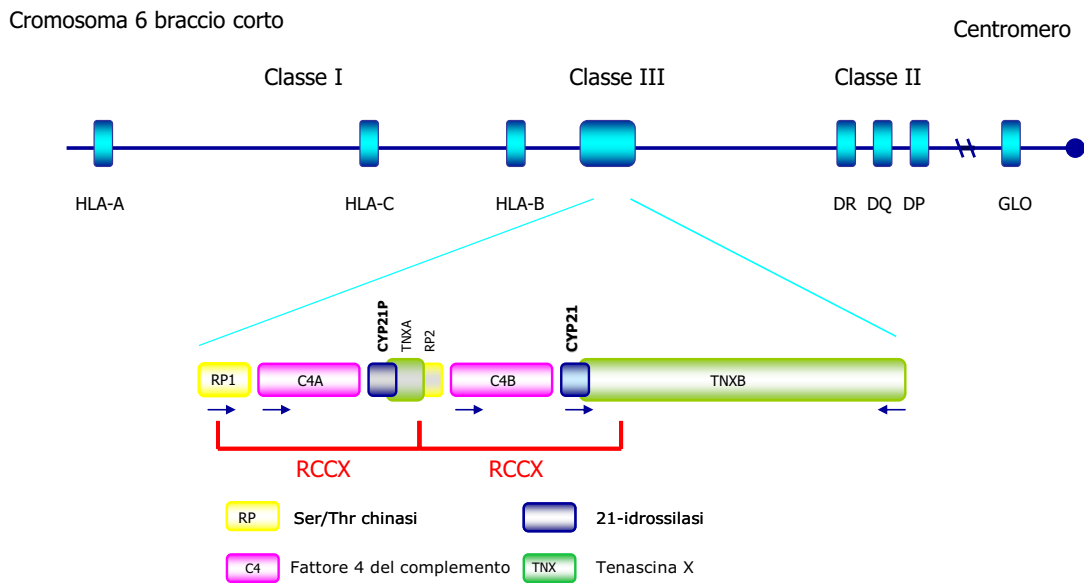


Figura 5. Rappresentazione schematica del locus degli HLA, dove si trova il gene *CYP21* per l'enzima 21-idrossilasi, e del modulo *RCCX*, nella forma bimodulare. I geni funzionanti hanno lo sfondo interno bianco, quelli non funzionanti grigio. Le frecce indicano l'orientamento della trascrizione dei geni.

IL GENE *CYP21A2*

Il gene *CYP21* (fig.6) è lungo 3.3 Kb circa, è formato da 10 esoni separati da nove introni di dimensioni relativamente piccole. Il cDNA è lungo 2 Kb circa ed ha un unico modulo di lettura aperto che dà origine ad una proteina di 494 amminoacidi. Lo pseudogene ha un'omologia di sequenza con quello funzionale del 98% a livello degli esoni e del 96% a livello degli introni e si trova ad una distanza di circa 30Kb.

Lo pseudogene è caratterizzato dalla presenza di mutazioni che lo rendono inattivo, pertanto non genera alcun prodotto proteico. Sembra comunque che l'inattività del gene abbia portato all'accumulo di mutazioni e non viceversa.

Proprio queste mutazioni presenti normalmente sullo pseudogene sono la causa più frequente di CAH quando si trovano sul gene attivo.

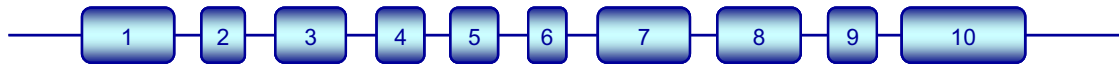


Figura 6. Diagramma del gene *CYP21*. Le dimensioni degli esoni sono proporzionate alla reale lunghezza in basi.

L'ESPRESSIONE

Il gene *CYP21* è espresso in maniera specifica nelle cellule della corteccia surrenale. La regolazione della sua espressione non è ancora del tutto chiarita a causa della presenza di numerosi trascritti parzialmente omologhi o complementari tra loro.

Nella sequenza genomica sono state riconosciute: la classica sequenza promotrice della trascrizione TATAAG (TATA box) a -38/-33 basi (bp) dall'ATG iniziale; la tipica sequenza CTGAC per l'inserzione del Cap in posizione -17/-13 e la sequenza segnale di poliadenilazione AATAAA, 486 basi a valle del codone finale, che nel cDNA è 21 bp a monte della coda di poly(A). Segnali d'inizio trascrizione sono stati individuati in 5' alla TATA box uno in posizione -118 e uno in posizione -53 e in 3' alla TATA box in posizione -9, quest'ultimo sembra essere il più potente dei tre.

Le regioni coinvolte nella regolazione dell'espressione del *CYP21* finora identificate sono due: il "promotore basale" che comprende le prime 200 basi in 5' al gene *CYP21* e il "promotore Z" molto a monte del gene in posizione -4.6/-5.0 Kb e comprende l'introne 35 del *C4A*.

Nel promotore basale un nucleotide di fondamentale importanza è la G in posizione -113, infatti studi *in vitro* (Chin KK et al, 1998) dimostrano che la

sostituzione di tale nucleotide con una A porta ad una diminuzione dell'80% della trascrizione basale del gene, dato che concorda con il livello di trascrizione dello pseudogene che in questa posizione ha una A. Questa alterazione che causa una diminuita espressione della 21-idrossilasi potrebbe essere un ulteriore difetto genetico da considerare in pazienti affetti da deficit di 21-idrossilasi.

Studi *in vivo* nel topo hanno dimostrato che il promotore basale non è in grado di produrre da solo un quantitativo d'enzima sufficiente, ma è necessaria anche l'altra regione promotrice.

Nel '99 è stato dimostrato (Wijesuriya SD et al, 1999) che il **promotore Z**, fa parte integrante del promotore del gene *CYP21* per l'espressione basale e adreno-specifica.

LA PROTEINA

L'enzima 21-idrossilasi è una proteina microsomiale di 55 KDa, composta da 494 amminoacidi, esiste anche una variante di 495 amminoacidi che contiene una leucina in più (Leu10) nel domino N-terminale.

L'enzima appartiene alla superfamiglia dei citocromi P450, proteine che contengono un gruppo eme e catalizzano reazioni d'ossidazione di substrati idrofobici.

Le regioni funzionali dell'enzima sono sostanzialmente quattro: la regione N-terminale per l'inserimento nella membrana, il sito catalitico contenente l'eme, il canale idrofobico per l'accesso dei substrati al sito catalitico (o tasca di legame del substrato), la regione d'interazione con l'enzima P450 reduttasi.

La struttura tridimensionale reale non è nota: la proteina non è stata infatti ancora cristallizzata a causa delle difficoltà tecniche dovute al suo inserimento in membrana come la maggior parte dei citocromi P450 dei vertebrati.

Le informazioni che si conoscono sono quindi state ottenute costruendo dei modelli di omologia basati sui citocromi già cristallizzati. Ad oggi sono note le strutture di 5 citocromi P450 di mammifero di cui 3 sono umani (*CYP2C9* (Williams PA et al, 2003), *CYP2C8* (Schoch GA et al, 2004), *CYP3A4* (Yano JK et al, 2004)) e 2 di coniglio (*CYP2C5* (Johnson EF et al, 2002) e *CYP2B4* (Scott EE et al, 2003)).

L'omologia di sequenza tra i diversi citocromi è molto ridotta ma la struttura tridimensionale risulta molto simile. Per esempio se si analizzano le strutture dei citocromi *CYP101/P450cam*, *CYP102/P450BM3*, *CYP108/P450terp*, l'identità di sequenza è minore del 10%, ma la regione del *core* centrale, che rappresenta il 50% della sequenza lineare, si differenzia nella struttura tridimensionale di circa 2 Å; non fanno parte di questa regione quei residui che sono coinvolti nel riconoscimento o nel legame del substrato, né quelli coinvolti nel legame del partner redox (Peterson JA et al, 1997).

L'ultimo modello costruito per omologia (Robins T et al, 2006) si basa sul citocromo *CYP2C5* di coniglio e anche da questo risulta che i domini funzionalmente importanti come la tasca dell'eme, le cisteine, i siti di legame al substrato risultano quasi perfettamente conservati.

LE MUTAZIONI

Il 95% degli alleli portatori di una mutazione sembra originato da eventi di ricombinazione tra il gene *CYP21* e lo pseudogene *CYP21P*.

La duplicazione in tandem dei geni *C4* e *CYP21*, infatti, nonché la loro elevata omologia di sequenza, può favorire un allineamento scorretto durante la meiosi e causare un crossing over ineguale (fig. 7): tale evento causa una **delezione** di 30 Kb che comprende la porzione 3' terminale del gene *CYP21P*, il gene *C4B* per intero, e la porzione 5' del gene *CYP21*, formando quindi un unico gene chimerico con la porzione 5' del gene *CYP21P* e la porzione 3' del *CYP21* (fig.

8). Questa delezione è presente nel 20% circa degli alleli, il restante 75% è dato dal trasferimento sul gene *CYP21* di porzioni dello pseudogene di dimensioni variabili da una singola base fino a 2 Kb. Tale fenomeno viene definito conversione genica, attribuendo a tale termine un significato diverso da quello originariamente riferito al fenomeno nei lieviti, in cui la struttura e la funzione di un gene su un cromosoma viene "convertita" in quella di un altro gene su un cromosoma omologo: in questo caso un segmento di un gene viene sostituito da quello di un gene strettamente correlato, il meccanismo è tuttora oggetto di studio. Uno studio delle ricombinazioni *de novo* su cellule di sangue periferico e sugli spermatozoi ha dimostrato che le delezioni avvengono solo durante la meiosi, mentre la conversione genica avviene principalmente, se non esclusivamente, durante la mitosi, quindi la conversione genica deve avvenire con un meccanismo diverso dal crossing over ineguale (Tusie-Luna MT et al, 1995).

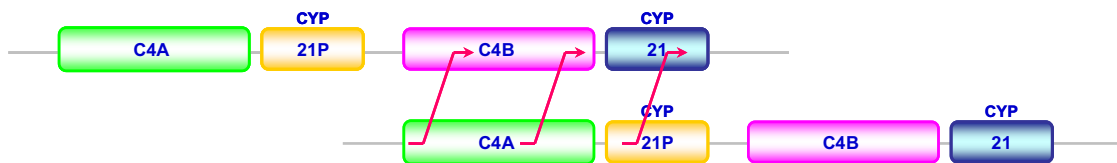


Fig. 7. Rappresentazione degli eventi di crossing over che possono coinvolgere i geni *C4* e *CYP21*.

Si parla di **larga conversione genica** (LGC, large gene conversion) quando la conversione porta alla formazione di un gene ibrido con il 5' del *CYP21P* e il 3' del *CYP21*, in altre parole il 5' del *CYP21* è "convertito" in quello del *CYP21P*, ma l'assetto degli altri geni della regione duplicata in tandem rimane invariato (5' - *C4A-CYP21P-CAB-CYP21*ibrido-3') (fig. 8).

Si parla di **microconversione** quando si trovano sul *CYP21* delle mutazioni puntiformi o di poche basi che sono presenti normalmente sullo pseudogene (fig. 10).

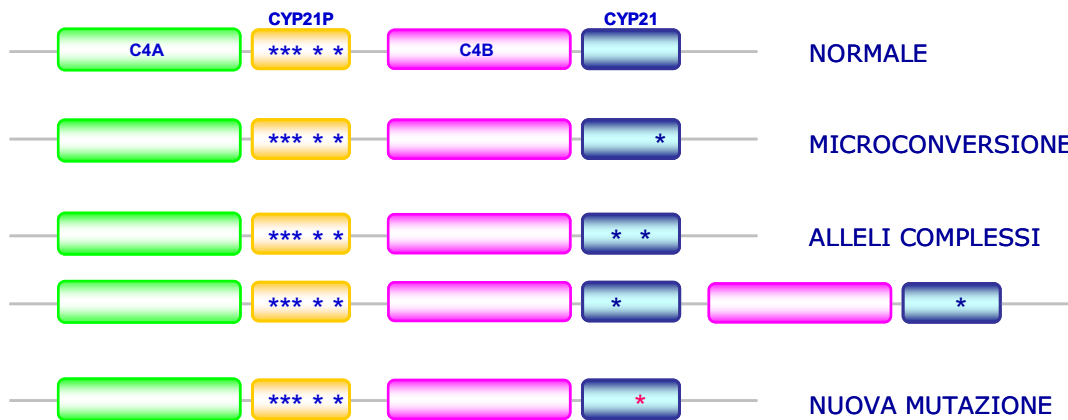


Fig. 8. Rappresentazione del gene *CYP21* e dei geni ibridi *CYP21P/CYP21* originati per delezione o larca conversione aenica.

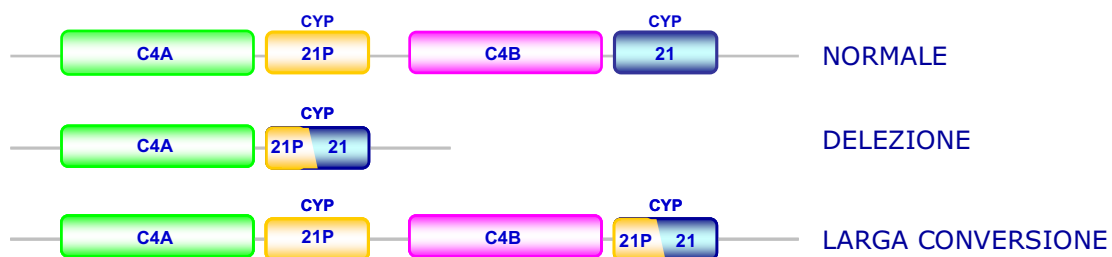


Fig. 9. Rappresentazione schematica della differenza tra alleli che portano nel gene *CYP21* una o piu' mutazioni derivate per microconversione genica oppure mutazioni non presenti nello pseudogene *CYP21P* (nuove).

Una piccola percentuale (5%) d'alleli affetti porta delle mutazioni che non sono di origine pseudogenica o che sono state trovate solo in una piccola percentuale di pseudogeni indicando probabilmente una più recente diffusione nella popolazione.

Un'ulteriore peculiarità genotipica del gene *CYP21* è la presenza d'alleli che portano contemporaneamente più di una mutazione sia nota sia nuova.

Tale fenomeno, insieme alla possibilità di un numero variabile di moduli RCCX, rappresenta un problema diagnostico poichè con la sola analisi mediante amplificazione specifica del gene *CYP21* e controllo delle segregazione degli alleli nella famiglia, non e' possibile stabilire se le mutazioni individuate su un singolo allele siano presenti su un unico gene *CYP21* e quindi esercitino un effetto sinergico o almeno associato alla mutazione piu' grave, oppure se esse siano presenti individualmente in piu' geni *CYP21* di un allele con tre o piu' moduli RCCX. Un esempio dei diversi tipi di alleli-malattia e' riportato in figura 10. Un numero minimo ma non ignorabile di mutazioni sono originate *de novo*, confermando la suscettibilità ad alterazioni del gene *CYP21*. Attualmente sono note circa 70 mutazioni, 10 sono quelle più frequentemente ritrovate nel *CYP21* per microconversione genica (fig. 10), le restanti sono mutazioni rare o trovate in singole famiglie.

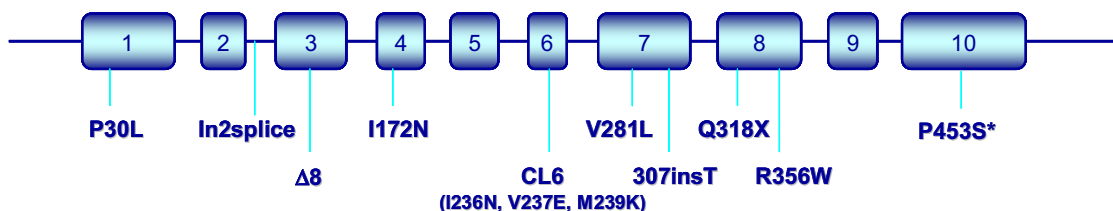


Fig. 10. Diagramma del gene *CYP21* e delle mutazioni ritrovate sul gene *CYP21* in seguito a microconversione genica in individui affetti da deficit di 21-idrossilasi. * la mutazione P453S e' presente solo in alcuni *CYP21P*.

CYP11B1

LA PROTEINA

Nell'uomo ci sono due isozimi con attività 11 β -idrossilasica che sono responsabili rispettivamente della sintesi del cortisolo e dell'aldosterone: CYP11B1 (P450XIB1, P450c11, 11 β -idrossilasi) e CYP11B2 (P450XIB2, P450c18, P450aldo, aldosterone sintasi). Sono entrambi citocromi P450 formati da 503 aminoacidi da cui viene tagliato il peptide segnale nei mitocondri originando proteine mature di 479 residui. La sequenza di queste proteine è identica al 93% (White PC et al, 1994).

CYP11B1 ha potente azione 11 β -idrossilasica ma non 18-idrossilasica, pertanto non è in grado di convertire il corticosterone in aldosterone, come invece può fare il CYP11B2.

CYP11B1 è localizzato nella matrice interna della membrana mitocondriale e appartiene alla classe I dei citocromi. Come per CYP21A2 non è disponibile la cristallografia della proteina e pertanto sono stati costruiti modelli per omologia. Lewis (Lewis DF et al, 1998) ha proposto un modello per CYP11, CYP17, CYP19 e CYP21 basato sulla cristallografia del citocromo batterico CYP102.

Krone (Krone N et al, 2005) ha recentemente proposto un modello tridimensionale usando come template la struttura a raggi-X del citocromo di mammifero CYP2C5. Anche in questo caso ne risulta che i domini funzionali hanno una elevata omologia di sequenza.

CYP11, come CYP21, agisce come mono-ossigenasi inserendo un atomo di ossigeno in un substrato idrofobico con formazione di una molecola di acqua. Diversamente da CYP21, in cui il trasferimento di elettroni è mediato dal NADPH, per il CYP11 è mediato da una flavoproteina contenente il FAD e da una redoxina ferro-zolfo. Tra i residui più importanti per i domini catalitici

spiccano la Cisteina 450 che forma il quinto legame con l'eme e la treonina 318 fondamentale per il trasferimento di protoni alla molecola di ossigeno.

IL GENE *CYP11B1*

CYP11B1 e *CYP11B2* sono codificati da due geni sul cromosoma 8q21-q22 distanti circa 40 kb. Entrambi contengono 9 esoni e sono lunghi circa 7 kb. La sequenza nucleotidica dei due geni è identica al 95% nella regione codificante e al 90% negli introni. La localizzazione degli introni in questi due geni è identica anche a quella di un terzo gene, la colesterolo desmolasi (*CYP11A*), che appartiene pertanto alla stessa famiglia anche se la sequenza aminoacidica è uguale solo al 36% (White PC et al, 1994).

Il gene *CYP11B2* si trova in 5' rispetto al gene *CYP11B1* se si considera il senso di trascrizione; ciò è stato dimostrato nel topo e studi di crossover nell'uomo dimostrano lo stesso arrangiamento.

I due geni sono regolati in modo diverso: mentre il *CYP11B1* è controllato dall'ACTH, il *CYP11B2* è regolato dai livelli di angiotensina II e di potassio.

Questa differenza di regolazione è probabilmente dovuta alle differenze che ci sono nelle due regioni 5' di questi geni. Entrambi i geni hanno una variante TATA box, una sequenza palindromica identica a quella vista in altri geni regolati da cAMP e alcune copie di una sequenza presente nella regione regolatoria di tutti i geni che codificano per idrossilasi steroidee nella corteccia surrenale e nelle gonadi. Gli elementi genetici responsabili della diversa regolazione dei due geni nella zona fascicolata e glomerulosa non sono ancora stati identificati, ma alcuni studi suggeriscono che ci sia un elemento regolatorio negativo nel 5' del *CYP11B2* che contiene una ripetizione invertita di alcune centinaia di basi, non presente nel *CYP11B1* (White PC et al, 1994).

LE MUTAZIONI

Gli ebrei di origine marocchina costituiscono la popolazione con frequenza più alta di deficit di 11 β -idrossilasi. In questo gruppo almeno uno degli alleli affetti porta la stessa mutazione, R448H. Tale residuo è vicino alla C450, che forma il quinto legame di coordinazione con l'eme. La arginina 448, o un residuo equivalente, è stata trovata conservata in tutti gli enzimi P450 eucariotici indicando che un cambiamento in tale punto non è ben tollerato.

Al momento sono riportate sul database HGMD 34 mutazioni tra missenso e nonsenso, 5 mutazioni di splicing, 4 piccole delezioni, 3 piccole inserzioni, 4 grosse delezioni e 3 riarrangiamenti complessi (Fig. 11).

CYP11B1 e CYP11B2 possono ricombinare e dare origine a un gene chimerico con le estremità 5' e 3' che corrispondono rispettivamente a CYP11B1 e CYP11B2. Questa chimera è fiancheggiata sull'allele da geni CYP11B2 e CYP11B1 normali; pertanto risultano 3 geni CYP11B sullo stesso allele. Il gene chimerico risulta regolato come il CYP11B1 (espresso ad alti livelli nella zona fascicolata e regolato da corticotropine) ma l'attività enzimatica è quella codificata dal CYP11B2 cioè di aldosterone sintasi. Questo gene chimerico risulta in una forma di ipertensione autosomica dominante: iperaldosteronismo sopprimibile con glucocorticoidi (GSH). Tutti i pazienti con questa patologia hanno un allele con un gene chimerico con punto di fusione tra l'introne 2 e l'esone 4 (White PC et al, 1994). Non è stato descritto finora alcun gene chimerico causante deficit di 11 β -idrossilasi

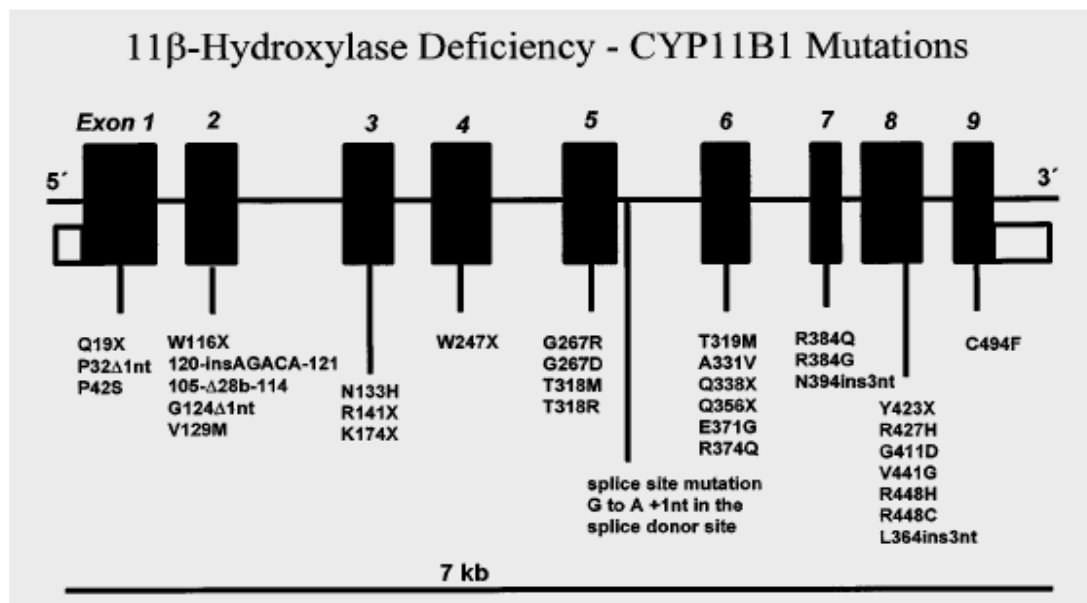


Fig. 11 Schema del gene CYP11B1 con alcune delle mutazioni descritte. Da Peter M et al, 1999.

CORRELAZIONE GENOTIPO-FENOTIPO

Sia nel deficit di 21-idrossilasi che in quello di 11 β -idrossilasi il fenotipo è determinato dall'allele che porta la mutazione meno grave. Questo perché l'attività residua dell'enzima dipende dalla proteina "meno alterata" che verrà prodotta dai due alleli.

Tenendo conto della diversa frequenza dei due deficit nella popolazione è facile dedurre che per la CYP21 è stato possibile compiere diversi studi in cui si comparava la gravità delle manifestazioni fenotipiche con le mutazioni trovate, mentre ciò è stato possibile in misura molto minore con la CYP11B1.

Per la CYP21, dal confronto tra i gruppi e sottogruppi dei pazienti e i loro fenotipi, determinati dall'analisi clinica, si è visto che esiste una corrispondenza tra la gravità del difetto enzimatico e la manifestazione della malattia. Nei primi studi effettuati tale correlazione non era ottima, si presentavano infatti casi in cui il fenotipo risultava più o meno grave rispetto a ciò che ci si aspettava da quella mutazione. In realtà si è visto poi che spesso

c'era sullo stesso allele una seconda alterazione che modificava l'effetto della prima.

Le mutazioni possono essere per comodità distinte in tre gruppi.

Il primo gruppo è costituito dalle mutazioni che aboliscono totalmente l'attività dell'enzima e sono chiamate mutazioni nulle. Queste mutazioni sono quelle che causano la forma più grave della malattia, cioè quella con perdita di sali e che non danno problemi di correlazione genotipo fenotipo. Il secondo gruppo di mutazioni è rappresentato da mutazioni che diminuiscono la normale attività enzimatica all'1-2% e si trovano soprattutto in pazienti con la forma di virilizzazione semplice. Il terzo gruppo comprende le mutazioni che producono enzimi con attività enzimatica del 20-60% e sono frequentemente associate al fenotipo non classico.

Mutazioni nulle ($\Delta 8$, CL6, 307insT, Q318X, R356W). Allo stato omozigote causano la forma con perdita di sali ed una virilizzazione grave nelle femmine. Non si sono mai viste eccezioni.

I2. Questa mutazione è considerata di poco meno grave di quelle nulle. E' associata sia alla forma SV sia SW. La virilizzazione dei genitali è sempre presente nelle femmine, mentre le manifestazioni da perdita di sali a volte non sono notate. Questa variabilità sembra essere causata da un effetto di dosaggio genico: i pazienti con SV erano omozigoti, quelli con SW emizigoti. Il fenotipo più lieve può dipendere anche dal quantitativo di RNA che subisce uno splicing corretto. Il ritrovamento d'elevata variabilità nel fenotipo risente anche della non corretta diagnosi di pazienti eterozigoti per tale mutazione, che risultavano omozigoti a causa di un fenomeno di allele-dropout scoperto nel 1996: l'allele normale portatore della C non veniva amplificato se si trovava in eterozigosi con la G dell'allele mutato. Erano riconosciuti eterozigoti solo i pazienti con l'allele normale con la A. In passato inoltre non si sequenziava

tutto il gene, ma si cercavano solo le mutazioni derivate dallo pseudogene, quindi altre eventuali mutazioni causa del fenotipo non venivano trovate.

I172N. In generale è causa della forma di virilizzazione semplice, spesso la virilizzazione è severa, ma il grado può variare. Anche questa mutazione presenta un effetto di dosaggio genico: lo stato omozigote è meno grave di quello emizigote che a volte è stato trovato nella forma SW. Questa variabilità si riscontra anche nella nostra popolazione.

P30L. La presenza di questa mutazione è stata ritrovata in molti casi di forme NC, ma a volte anche in forme con una lieve clitoromegalia prenatale. Anche nella nostra popolazione abbiamo trovato dei pazienti con una forma più grave di quella attesa, ma tali pazienti presentavano anche una alterazione nel promotore a livello del nt -113 che è stato dimostrato essere causa di una diminuita trascrizione del gene.

V281L e P453S Queste mutazioni in letteratura sono sempre associate alla forma non classica. Non sono noti casi di gravità maggiore in cui siano state trovate. Questo dato è confermato anche nella nostra popolazione.

Sostanzialmente si ritiene che la correlazione sia buona anche se in letteratura ci sono ancora diatribe in tal senso. E' da tener conto comunque che ci sono diversi fattori che complicano una accurata correlazione: I) la suddivisione dei fenotipi in tre categorie è arbitraria ed effettuata per facilitare il management dei pazienti, ma in natura la manifestazione della malattia è un continuum; II) la distinzione tra forma SV e NC è difficile nei pazienti maschi nei quali gli effetti dell'androgenizzazione non sono visibili alla nascita; III) i livelli di 17-OHP (sia basale che da stimolo), soprattutto nelle forme lievi in cui il fenotipo è meno definito, sono molto variabili e si sovrappongono sia alla forma SV che ai semplici portatori.

La gravità della mutazione e il loro coinvolgimento nell'espressione del fenotipo può essere schematizzata nella figura sottostante (fig. 12).

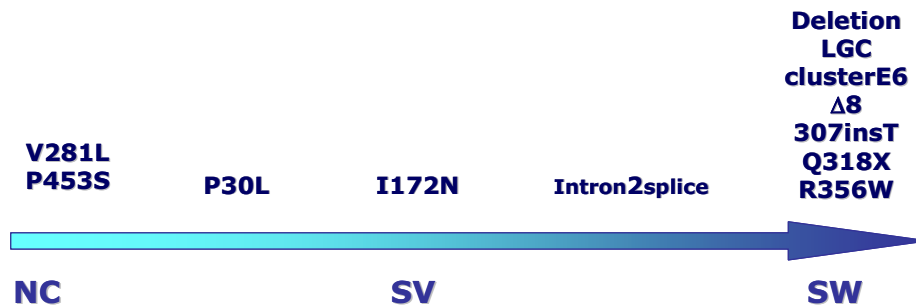


Figura 12. Rappresentazione schematica della correlazione genotipo/fenotipo. La freccia rappresenta l'aumento del grado di severità del fenotipo da NC a SW, in basso, e la riduzione in attività dell'enzima a seconda delle mutazioni presenti, in alto.

Come già detto prima, più difficile è stabilire una correlazione per la CYP11B1 data l'esiguità dei pazienti a disposizione.

Tutte le mutazioni riportate finora nelle forme classiche aboliscono completamente l'attività enzimatica, ma i pazienti mostrano diverse severità e anche diversi segni fenotipici: ad esempio non c'è correlazione tra il grado di ipertensione e di virilizzazione in pazienti omozigoti per la R448H e hanno anche diversi livelli ormonali e urinari di precursori e metaboliti.

Sono state descritte due sorelle con una mutazione non senso omozigote che presentano un grado lieve di virilizzazione, mentre ci aspetterebbe, a causa della presenza di una proteina trunca, un fenotipo più grave (White PC et al, 1994). Per il deficit di 11B-idrossilasi quindi non sembra esserci per ora una buona correlazione, probabilmente ci sono fattori esterni ancora sconosciuti che intervengono a modificare la risposta.

"MANAGEMENT" DEI PAZIENTI E DIAGNOSI PRENATALE

Terapia sostitutiva. Il principio del trattamento è somministrare una dose di cortisolo equivalente a quella normalmente secreta. Questo produce un effetto di feed back negativo sulla secrezione di CRH e ACTH così da sopprimere la produzione di precursori del cortisolo e di androgeni surrenalici. Nei casi con perdita di sali si somministra anche un mineralcorticoide. Nei casi di deficit di 11B-idrossilasi in cui l'ipertensione si sia prolungata per lungo tempo, quindi non risponda subito al trattamento sostitutivo, si usano anche antiipertensivi. Il trattamento viene adeguato alle esigenze del singolo paziente (nel quale sono controllati i livelli ormonali e i segni clinici: età ossea, altezza e velocità di crescita) e come riferimento iniziale può essere utile la conoscenza dell'assetto genotipico.

Intervento chirurgico. La correzione della virilizzazione dei genitali esterni nelle bambine viene eseguita presto, dalla dodicesima settimana di vita entro i due anni, età alla quale la paziente può divenire consapevole dell'anormalità dei propri genitali. La difficoltà e la riuscita dell'operazione dipendono dal grado di virilizzazione e purtroppo i risultati non sono sempre soddisfacenti.

Screening neonatale. Lo screening è effettuato solo per il deficit di 21-idrossilasi data la frequenza maggiore. Consiste nel dosaggio dei livelli di 17-idrossiprogesterone da un prelievo di sangue su filtro di carta e consente di individuare il 100% dei neonati affetti dalla forma classica ed il 27% circa di quelli con la forma non classica (Azziz R et al, 1994). Nei vari paesi e centri in cui viene effettuato, (è possibile dal 1977), il verificarsi della crisi da perdita di sali è un evento molto raro ed è stato possibile calcolare che prima dell'introduzione di tale screening il 70% dei pazienti sfuggiva alla diagnosi. A tutt'ora in alcuni paesi ed in alcune regioni dell'Italia lo screening neonatale non è in vigore e in tali popolazioni alcuni pazienti sfuggono alla diagnosi, come

dimostrato nella popolazione inglese in cui i maschi affetti da forma grave sono sottorappresentati, indicando la mancata diagnosi e morte in età neonatale (Nordenstrom A et al, 2005).

Per il deficit di 11 β -idrossilasi non si esegue uno screening specifico; a volte però si individuano alcuni casi in quanto presentano anche un livello alto di 17-OHP. Il dosaggio specifico di 11-deossicortisolo si effettua solo nelle famiglie a rischio.

Diagnosi genetica. Alcuni centri hanno cominciato ad affiancare allo screening la diagnosi genetica (Nordenstrom A et al, 1999), in particolare per la ricerca delle nove mutazioni più frequenti derivanti dalla pseudogene, ma i limiti di tali indagini, nonché il loro costo tuttora elevato, non hanno ancora consentito di utilizzare queste tecnologie per un'analisi su larga scala.

Diagnosi e terapia prenatale. La diagnosi prenatale assume un'importanza particolare nell'iperplasia surrenale congenita, perché il trattamento prenatale di un feto a rischio rappresenta un'opzione terapeutica (Levine LS, 1994; Speiser PW, 1994). Viene iniziato immediatamente dopo la positività del test di gravidanza, consiste nella somministrazione alla mamma di una dose orale giornaliera di dexametasone, che è uno steroide in grado di attraversare la placenta. Tale trattamento evita la virilizzazione dei genitali esterni nei feti femmina.

La diagnosi prenatale all'inizio era effettuata al secondo semestre di gravidanza sul liquido amniotico con la misurazione dei livelli di 17OHP (o di 11-deossicortisolo per il deficit di 11 β -OH) poi, determinata la mappa del locus del gene *CYP21*, con la tipizzazione degli HLA delle cellule fetali. Tra gli svantaggi della tipizzazione degli HLA e dell'analisi di linkage per la diagnosi ci sono il rischio di un evento di ricombinazione tra i marker e il gene *CYP21*, la mancata rilevazione di una mutazione de novo e l'assoluta necessità di tutta la famiglia

per vedere la segregazione degli alleli. La diagnosi prenatale ora viene eseguita a partire dal prelievo dei villi coriali in decima settimana di gestazione, e consiste di due analisi: il cariotipo per determinare il sesso del feto e l'analisi del gene *CYP21* (o *CYP11B1*). La diagnosi viene eseguita solo in quelle famiglie in cui gli alleli sono completamente caratterizzati. L'attuale diagnosi prenatale permette quindi di interrompere il trattamento nei casi in cui non è necessario: feti maschi (indipendentemente dal genotipo) e feti femmina non affetti. In alcune popolazioni, in cui la correlazione genotipo/fenotipo è buona, si sospende il trattamento anche nei feti con il genotipo associato alla forma lieve.

OBIETTIVI DEL PROGETTO

Presso il Laboratorio di Genetica Molecolare del Dipartimento di Pediatria viene effettuata la diagnosi molecolare di deficit di 21-idrossilasi dal 1995. I pazienti provengono sia direttamente dal centro di Endocrinologia Pediatrica, sia da strutture ospedaliere esterne di tutta Italia. Presso il Centro di Endocrinologia Pediatrica del S.Orsola ha sede il centro di screening neonatale regionale per il deficit di 21-idrossilasi (Balsamo A et al, 1996), dove 30.000 neonati l'anno vengono analizzati al terzo o quarto giorno di vita. Lo screening, tramite dosaggio dei livelli del 17OHP, permette di individuare tutti i pazienti affetti dalla forma grave ed il 27% circa delle forme lievi. I restanti pazienti affetti dalla forma lieve sono individuati dalla diagnosi clinica, confermata dall'ACTH test.

Inizialmente la diagnosi molecolare era basata sulla ricerca delle mutazioni più frequenti, dal 2000 si è passati al sequenziamento dell'intera sequenza genomica, comprese le prime 360 basi circa del promotore, per poter caratterizzare un numero maggiore di alleli-malattia; le tecniche impiegate sono in continua evoluzione.

Gli obiettivi di questa tesi di dottorato sono incentrati sull'implementazione delle tecniche e delle metodiche a disposizione e sulla rivalutazione del lavoro svolto presso il Laboratorio in questo decennio.

I punti in cui si divide il progetto di ricerca del mio dottorato sono i seguenti:

- rivalutazione dei pazienti e delle relative famiglie analizzate prima del 2000 con le attuali tecniche e conoscenze acquisite al fine di raggiungere una ottimale correlazione genotipo-fenotipo.
- terminare l'analisi genetica in famiglie rimaste in sospeso per problemi tecnici o per difficoltà interpretative dei risultati

- allestimento di un database contenente i dati genetici (mutazioni e polimorfismi) e clinici (forma della patologia e ACTH test) di tutti i pazienti analizzati dal Laboratorio dal 1995 ad oggi
- messa a punto di tecniche rapide per l'individuazione di situazioni particolari: allele dropout, gene chimerico, segregazione allelica, delezione/duplicazione moduli
- rivalutazione e interpretazione di alcune varianti individuate in regioni non codificanti (promotore, introni, 3' UTR)
- messa a punto dell'analisi del gene CYP11B1 per aumentare la risposta genetica nei casi di iperplasia surrenale congenita.

PAZIENTI

In questo lavoro sono stati valutati pazienti che fanno parte sia della casistica del Servizio d'Endocrinologia Pediatrica di Bologna, individuati attraverso lo screening neonatale o la presenza di sintomi clinici, sia pazienti provenienti da diversi centri italiani.

Per i pazienti con deficit di 21-idrossilasi, data la numerosità del campione si riporta una breve descrizione clinica solamente dei pazienti che presentano la sostituzione studiata *in vitro*.

Per i pazienti con deficit di 11 β -idrossilasi, si riportano invece i dati di tutti i pazienti analizzati.

DEFICIT DI 21-IDROSSILASI

M.A. Valutata all'età di 6 anni per pubarca precoce, età ossea avanzata (7.5 anni). Presentava lieve ritardo psico-motorio ed epilessia mioclonica giovanile. I dosaggi ormonali hanno presentato valori anomali (basali/dopo stimolo): 17-OHP 559/2560 ng/dl, F (cortisolo) 200/349 ng/ml, D4-A (delta4-androstenedione) 65/112 ng/dl. In terapia dall'età di 7 anni con desametasone. Altezza finale di cm 162 (target familiare cm 161).

B.D. Ha mostrato segni di pubarca all'età di 6 anni con età ossea avanzata (8.5 anni). Valori ormonali all'età di 7 anni (basali/dopo stimolo): 17-OHP 1135/3800 ng/dl, F 236/215 ng/ml, D4-A 83/102 ng/dl. Inizialmente in terapia con decapeptyl per un anno e poi con idrocortisone dall'età di 9 anni. Altezza finale di cm 168.9 (target familiare cm 173).

G.S. Pubarca a 5.5 anni. Prima visita a 6.7 anni in cui ha mostrato un'età ossea di 10 anni. Valori ormonali all'età di 7 anni (basali/dopo stimolo): 17-OHP 8200/14600 ng/dl, F 190/170 ng/ml, D4-A 315/377 ng/dl. In terapia con

idrocortisone dall'età di 7 anni. Altezza finale di cm 155.8 (target familiare cm 157.5).

G.M. Ha presentato una iperpigmentazione dello scroto a 6 mesi. Storia familiare: fratello con virilizzazione semplice con genotipo R356Q / I2.

Valutazione ormonale a 6 mesi (basali/dopo stimolo): 17-OHP 197/1640 ng/dl, F 170/312 ng/ml, D4-A 14/37 ng/dl. Ultima visita all'età di 2 anni in cui è risultato asintomatico. Il padre risulta apparentemente asintomatico e mostra i seguenti valori: 17-OHP 182/1070 ng/dl, F 181/341, D4A 179/299.

F.C. ACTH test all'età di 12,1 anni con 17OHP 160/1670 ng/dl; altezza cm 153,8 menarca 11,7 anni; non apparente sintomatologia clinica. Storia familiare: fratello con forma non classica data dal genotipo V281L / I172N-CL6. Anche il padre risulta asintomatico.

B.S. 1a visita per pubarca ed axillarca precoci insorti all'età di 5,8 anni; ACTH test all'età di 6,4 anni con 17OHP 0'/60' 255/1790 ng/dl; età ossea 8,8 anni all'età cronologica di 6,6 anni; canale di crescita (circa 30° percentile) al di sotto del bersaglio genetico (163 cm = 50° percentile); non è attualmente in trattamento.

D.E. apparentemente asintomatico; altezza finale 172 cm, depresso; non ha mai eseguito ACTH test. Anche il padre non presenta una apparente sintomatologia clinica, altezza cm 164 (-1.7 SD), fasi nella pubertà riferite nella norma; 17OHP (basale e dopo stimolo con ACTH) 179/3580 ng/dl.

DEFICIT DI 11 β -IDROSSILASI

B.R. Femmina 46,XX nata a termine da genitori italiani non consanguinei. Vista dal nostro centro all'età di 10 giorni per ambiguità genitale: stadio Prader II-III e iperpigmentazione. Gli esami ormonali hanno mostrato valori normali di 17-OHP e cortisolo e valori elevati di testosterone (1.7 ng/ml; n.v. 0.36-0.58), ACTH (333 pg/ml; n.v. 5.0-60.0) e PRA (>5 mg/ml/h; n.v. 0.5-3.0). Non mostrava segni clinici di ipertensione. Inizialmente trattata con Cortone Acetato (43.0 mg/m² /cortisolo Eq) e Fludrocortisone (0.025 mg/die) in quanto non era possibile effettuare il dosaggio di 11-deossicortisolo (DC) e 17-OH-pregnenolone. Successivamente il dosaggio di 11-DC ha mostrato livelli elevati (7.54 ng/ml) confermando il deficit di 11 β -idrossilasi. Durante il follow up ha mostrato più volte livelli elevati di ACTH (>1250pg/ml) e di PRA associati ad aumento di pigmentazione. Il menarca si è presentato all'età di 13 anni e ha raggiunto l' altezza finale target.

P.A. 46,XY nato a termine da gravidanza normale. Ha manifestato segni puberali all'età di 5.3 anni con un velocità di crescita molto accelerata (altezza > 97° percentile). I primi dosaggi ormonali hanno mostrato livelli elevati di T (0.53-0.32 ng/ml) e di 17-OHP (2.0-4.1 ng/ml). All'età di 6.3 anni l'età ossea è risultata avanzata di 5 anni e il test con ACTH ha dato i seguenti risultati: 17OHP 181/1148 ng/dl; D4-A 426/473 ng/dl; DHEA 8.4/17.2 ng/ml; F 122/172 ng/ml; T 0.5 ng/ml. E' stato trattato con Idrocortisone e un analogo del GnRH per bloccare la pubertà precoce (volume testicolare 3-4 ml).

F.G. 46, XX nata a termine da genitori di origine italiana meridionale. Giunta all'osservazione all'età di 3 mesi per ambiguità genitali (stadio di Prader III). Era risultata negativa allo screening neonatale per CAH ma i successivi esami

ormonali sono risultati massivamente elevati: 17-OHP 2430 ng/dl , androstenedione 1400 ng/dl, T 1.8 ng/ml, ACTH 329 pg/ml, PRA >25 ng/ml/h. Gli elettroliti e la pressione sanguinea risultavano nei valori normali. E' stata trattata inizialmente con idrocortisone e poi dai 6 anni anche con un analogo del GnRH. La differenza tra il grado di virilizzazione e il livello di 17OHP faceva sospettare per un deficit di 11-idrossilasi poi confermato dal dosaggio di 11-DC (9.51 ng/ml). Il menarca è sopraggiunto all'età di 12 anni e attualmente (13.3 anni) ha raggiunto un'altezza molto vicina al target finale.

B.L. Femmina 46,XX nata a termine da genitori di origine italiana settentrionale. Osservata dal nostro centro all'età di 10 mesi per ipertrofia clitoridea e fusione delle piccole labbra. I valori ormonali dopo ACTH test hanno mostrato un quadro tipico da 11OHD (valori basali e dopo stimolo): 11-DC 10.1/19.6 ng/ml; 17-OHP 380/2040 ng/dl; T 0.68/1.39 ng/ml. I valori basali di cortisolo, ACTH e PRA sono risultati rispettivamente 138 ng/ml, 104 pg/ml e 1.39 ng/ml/h. Non ha evidenziato segni di ipertensione. La paziente è in trattamento con idrocortisone, mostra una curva di crescita normale; attualmente ha 11.8 anni e non ha avuto il menarca.

G.M. Alla nascita attribuito sesso maschile anche se mostrava ipospadia e testicoli nel canale inguinale. Non ha avuto crisi di perdita di sali. All'età di 7.4 anni è stato eseguito il cariotipo risultato 46,XX ei dosaggi ormonali: 17-OHP 2800 ng/dl; T 0.74 ng/ml; F 213.3 ng/ml; Na 137 mEq/L; K 5.1 mEq/L; Cl 105.8 mEq/L. I valori basali di cortisolo, ACTH e PRA sono risultati rispettivamente 138 ng/ml, 104 pg/ml e 1.39 ng/ml/h. L'esame clinico dei genitali ha mostrato la presenza di micropene e sacco scotale vuoto con testicoli non palpabili.

MATERIALI E METODI

ESTRAZIONE DEL DNA

Il DNA genomico dei soggetti da analizzare è stato estratto da leucociti di sangue periferico (3 ml di prelievo fresco o stoccato a -80°C) utilizzando il kit Wizard Genomic DNA purification (Promega). La qualità e la concentrazione del DNA ottenuto sono state calcolate allo spettrofotometro.

AMPLIFICAZIONE SPECIFICA DEL GENE *CYP21A2*

Il gene *CYP21A2* è stato amplificato in tre frammenti parzialmente sovrapposti (P1P2, CD, P3P4) dal nt -420 al nt 2907 utilizzando primer disegnati nei punti di maggiore diversità tra gene *CYP21* e pseudogene *CYP21P* (TAB.1) in modo da ottenere un prodotto specifico.

Frammento	Primer	Sequenza 5'-3'	Lunghezza frammento
P1P2	P1	TTCAGGCGATTTCAGGAAGGC	1154 bp
	P2 ^a	CAGAGCAGGGAGTAGTCT	
P3P4	P3 ^a	CCTGTCCTTGGGAGACTACT	2201 bp
	P4	TCTCGCACCCCAGTATGACT	
CD	C ^a	AAGGTCAGGCCCTCAGCTGCCTTCA	1099 bp
	D	ATGTGCAGCTGCCCTTCCAGG	

TAB.1 Primer di amplificazione standard e lunghezza frammenti per il gene *CYP21A2*.

^a primer specifico per il gene *CYP21A2*.

Inoltre sono state messe a punto altre PCR aggiuntive da utilizzare per risolvere casi particolari:

INDICAZIONE	PCR	ESITO
Mancanza di eterozigosità nel frammento CD (sospetta perdita di un allele)	CP2-P2	Positivo in presenza di nt di origine pseudogenica nel primer C
Assenza di eterozigosità su tutto il gene (sospetto allele con del/conv)	Gene CHIMERICO	Positivo solo in presenza di un gene di fusione 5'psg-3'gene
presenza di mutazione delta8	GENE 21OH	Amplificato su cui sequenziare allele con delta8
Casi di specificità dubbia nelle normali amplificazioni	PSEUDOGENE	Amplificato su cui sequenziare regione dubbia
Necessità di verificare il 3' UTR	E-3'21	Amplificato su cui sequenziare 3' UTR

I primer utilizzati e la lunghezza dei frammenti sono mostrati nella tabella 2.

Frammento	Primer	Sequenza 5'-3'	Lunghezza frammento
CP2-P2	CP2 ^b	CCT CGG CTT CCT TGG TCA	110 bp
	P2 ^a	CAGAGCAGGGAGTAGTCT	
CHIM	CHIM-F ^b	GGG TCG GTG GGA AGG CAC CTG AG	3298 bp
	CHIM-R ^a	AAT TAA GCC TCA ATC CTC TGC AGC G	
Gene-21OH	A21 ^a	TCG GTG GGA GGG TAC CTG AAG	3298 bp
	CHIM-R ^a	AAT TAA GCC TCA ATC CTC TGC AGC G	
PSG	CHIM-F ^b	GGG TCG GTG GGA AGG CAC CTG AG	3298 bp
	Rev21P ^b	GAT TAA GCC TCA ATC CTC TGC GGC A	
E-3'21	E ^a	AGA AGA GGG ATC ACA TCG TGG AGA T	2018 bp
	3'21	AAC CTC AAC GGG CTC TAC GGG	

TAB.2 Primer di amplificazione particolari e lunghezza frammenti per il gene CYP21A2.

^a primer specifico per il gene CYP21A2 ^b primer specifico per lo pseudogene.

La mix di reazione prevede in un totale di 50 µl: 200 ng di DNA genomico, 15 pmoli d'ogni primer, dNTP 0.02 mM, H₂O sterile bidistillata, 2.5 U d'enzima polimerasi Expand (Roche) con il corrispondente buffer. Solo per il frammento

CD si è reso necessario l'utilizzo di una polimerasi il cui buffer fosse privo di KCl, per evitare il fenomeno di "allele dropout", già descritto precedentemente (Day DJ et al, 1996), e consentire l'amplificazione dell'allele con la C in posizione 656 anche quando esso si trovi in condizioni d'eterozigotità con la G. Per tale motivo si sono utilizzate o la Taq Tth DNA Polimerase (Epicentre Technologies) o la Taq Platinum H.F. (Invitrogen). I cicli di amplificazione usati per tutti i frammenti sono mostrati in TAB.3

Un decimo del volume della reazione viene sottoposto ad elettroforesi in gel d'agarosio all'1.5%, a 60 Volt per 50 minuti, poi visualizzati al transilluminatore e fotografati.

P1P2	CD	CHIM/PSG/gene 21OH
<u>95°C 5'</u> 95°C 1' 59°C 30'' x 5 <u>72°C 1' 30''</u> 95°C 1' 57°C 30'' x 27 <u>72°C 1' 30'' + 2''*</u> 72°C 10' 4°C 10' 12°C ∞	<u>95°C 5'</u> 95°C 40'' 63°C 30'' x 5 <u>72°C 1' 20''</u> 95°C 1' 61°C 30'' x 25 <u>72°C 1' 20'' + 2''*</u> 72°C 5' 4°C 10' 12°C ∞	<u>94°C 5'</u> 95°C 30'' 67°C 30'' x 30 <u>68°C 3' + 1''*</u> 72°C 7' 4°C 10' 12°C ∞
P3P4	CP2P2	E-3'21
<u>95°C 5'</u> 95°C 1' 58°C 30'' x 5 <u>72°C 2' 20''</u> 95°C 1' 56°C 30'' x 25 <u>72°C 2' 30'' + 2''*</u> 72°C 10' 4°C 10' 12°C ∞	<u>95°C 5'</u> 95°C 30'' 57°C 30'' x 25 <u>72°C 20''</u> 72°C 7' 4°C 10' 12°C ∞	<u>95°C 5'</u> 95°C 30'' 64°C - 1°C* ² 1' x 7 <u>72°C 1'</u> 95°C 30'' 58°C 1' x 30 <u>72°C 1'</u> 72°C 7' 4°C 10' 12°C ∞

TAB.3 Cicli di amplificazione per il gene CYP21A2: * incremento di tempo a ogni ciclo

*² diminuzione della temperature ad ogni ciclo.

AMPLIFICAZIONE SPECIFICA DEL GENE *CYP11B1*

Per il gene *CYP11B1* sono state progettate 3 coppie di primer specifiche (TAB. 4) in grado di discriminare il gene *CYP11B1* dal suo omologo *CYP11B2*. Pertanto il gene è stato amplificato in tre frammenti diversi e parzialmente sovrapposti (A,B,C) di cui è stata verificata la specificità.

Frammento	Primer	Sequenza 5'-3'	Lunghezza frammento
A	AF ^a	CAT GAC GTG ATC CCT CCC GAA G	2368 bp
	AR	GTA GTA GGG GGG AGG GAT TTT CTG	
B	BF ^a	AGA CAC TTC ACT GGG GCT GCT G	1697 bp
	BR	AAA TCC TAA TGC CCA TCC AAA CCC C	
C	CF ^a	TCT TAC TTG GGA TTG TGA TGT GAT A	1925 bp
	CR	GCT TAG CCT GGC AAA CCC TG	

TAB.4 Primer di amplificazione e lunghezza frammenti per il gene *CYP11B1*.

^a primer specifico per il gene *CYP11B1*.

La mix di reazione prevede in un totale di 50 µl: 200 ng di DNA genomico, 15 pmoli d'ogni primer, dNTP 0.02 mM, H₂O sterile bidistillata, 2.5 U d'enzima polimerasi Expand (Roche) con il corrispondente buffer.

I cicli di amplificazione utilizzati sono elencati in tabella 5.

5 µl della reazione di PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi in gel d'agarosio all'1.5%, a 60 Volt per 50 minuti, poi visualizzati al transilluminatore e fotografati.

A	B	C
95°C 5'	95°C 5'	95°C 5'
95°C 1'	95°C 1'	95°C 1'
60°C 30'' x 5	65°C 30'' x 5	60°C 30'' x 30
72°C 1' 40''	72°C 1' 40''	68°C 2' 30'' + 2''*
95°C 1'	95°C 1'	72°C 7'
57°C 30'' x 25	63°C 30'' x 25	8°C 10'
72°C 1' 40'' + 2''*	72°C 1' 40'' + 1''*	14°C ∞
72°C 10'	72°C 10'	
8°C 10'	8°C 10'	
14°C ∞	14°C ∞	

TAB.5 Cicli di amplificazione per il gene CYP11B1: * incremento di tempo a ogni ciclo

PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI PCR

I prodotti di PCR sono stati purificati mediante separazione su colonna con il kit QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen). 3 µl dei prodotti purificati sono stati caricati su gel d'agarosio insieme con un campione di controllo specifico e quantificati in base all'intensità delle bande.

SEQUENZIAMENTO DIRETTO

La quantità di DNA purificato necessario viene portato ad un volume di 10 µl con H₂O sterile bidistillata e denaturato a 86°C per 3 minuti, successivamente vengono aggiunti il primer specifico (Tabelle 6 e 7) e i reagenti del kit per sequenziamento DTCS (Dye Terminator Cycle Sequencing, Beckman) e la reazione, in un volume totale di 20 µl, avviene nel termociclatore con il seguente programma di 25 cicli: 96°C 20'', 50°C 20'' e 60° 4'.

I prodotti della reazione di sequenza sono precipitati utilizzando un kit commerciale (Seq-prep kit GD400, GeneDia) e risospesi in una soluzione contenente formammide fornita dal kit di precipitazione. Il DNA è stato quindi sequenziato tramite elettroforesi capillare nel sequenziatore automatico

CEQ2000 (Beckman). I risultati sono stati direttamente elaborati dal software del sequenziatore, e in seguito analizzati dall'operatore tramite la stampa degli elettroferogrammi utilizzando il software Chromas.

PRIMER	SEQUENZA 5'-3'
A2	GAAGGTGGGGCCAAGGGAG
BF3	CCCATCTACAGGCTCCACC
BR2	GGGAGACAGCCAAAGCAGC
ETR	CCCTGAGGTGCCACTTATAG
FF	GTGAAAATGTGGTGGAGGCTGGTC
M	AAGCACAGCCCCAGCCGCA
P71	GAGCAATAAAGGAGAACTG
Q	TCGGGTCAGCCTCGCCTCTC
R	TGCGGCTGGGGCTGTGCTT
S2	TCTCATGCGCTGTGGAGAAA
VF	ACG TGA TTC CCT TTC TCA GG
VR	AGA CCT GGA TTG GGG AAG AA
W	CGCCTCCCCACCCACCTGTC

TAB.6 Principali primer di sequenza usati per il gene CYP21A2.

PRIMER	SEQUENZA 5'-3'
A1R	CAG CGC CAC AGA CCA GCA C
AIR2	GGG AAT GGC AGT GCT GAG TG
A2F	CTG CAG GGT GGG GCT AGC G
A2R	GCT CAC CCT CAC TGC CCA C
B4F	CCA GCA TCT TCC ACT ACA CC
B3R	GGA GGA TGC ACT GCT GAG C
B5F	GAG AAT TTG GGA TGA GAG CAG GG
C7-8F	TAA GTT AGG GGA GGT TTG GCC
C7-8R	GGC CCA GGT TCT CCC AGT AC
C9F	GTA AGG TGG GGC TGG TCA G
C6R	GGC CAA ACC TCC CCT AAC TTA
B4R	CCC TGC TCT CAT CCC AAA TTC TC

TAB.7 Primer utilizzati per il sequenziamento del gene CYP11B1.

MICROSATELLITI

Per l'analisi di segregazione degli alleli nelle famiglie sono state cercate le regioni variabili per numero di ripetizioni (VNTR) sul cromosoma 6 prossimali al gene *CYP21A2*.

Si è scelto di analizzare 2 microsatelliti a monte e due a valle del gene: $TNF\alpha$, D6S273, LH1, TAP1 (Fig. 13).

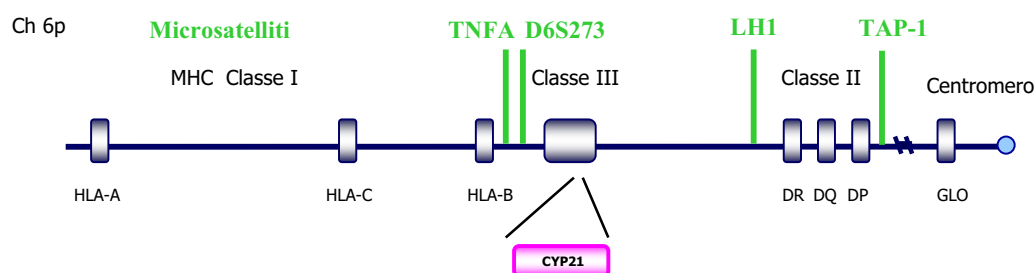


Figura 13. Posizione relativa dei 4 microsatelliti analizzati rispetto al locus del gene *CYP21*.

I primer usati sono mostrati in tabella 8: il primer senso è marcato in 5' con il fluoroforo DyeD4 (Beckman). La mix di reazione prevede in un totale di 10 μ l: 50 ng di DNA genomico, 1,5 pmoli d'ogni primer, dNTP 0.02 mM, H₂O sterile bidistillata, 1 U d'enzima polimerasi Roche con il corrispondente buffer 1X. Il ciclo di amplificazione è mostrato in tabella 9.

VNTR	PRIMER	SEQUENZA 5'-3'
$TNF\alpha$	TNFA-F	GCC TCT AGA TTT CAT CCA GCC ACA
	TNFA-R	CCT CTC TCC CCT GCAACA CAC A
D6S273	D6S273-F	GCA ACT TTT CTG TCA ATC CA
	D6S273-R	ACC AAA CTT CAA ATT TTC GG
LH1	LH1-F	CTA GTT GAA TGT TGA AGG TGT ACC
	LH1-R	GCT AGT CTG TGC CAA GGA ACT C
TAP1	TAP1-F	TTT TTC CAA CAG AAC CAG AC
	TAP1-R	GGA CAA TAT TTT GCT CCT GAG G

TAB.8 Primer utilizzati per amplificare i microsatelliti.

MICROS CYP21		
95°C	5'	
95°C	30''	
64°C - 1°C* ²	30''	x 7
72°C	30''	
95°C	30''	
58°C	30''	x 30
72°C	30''	
72°C	5'	
4°C	10'	
12°C	∞	

TAB.9 Ciclo di amplificazione: *² diminuzione della temperature ad ogni ciclo.

Dopo l'amplificazione 3 µl di prodotto vengono caricati su gel d'agarosio al 3%. Da 0.5 a 1 µl di prodotto di reazione (in base all'intensità della banda) vengono corsi su sequenziatore capillare CEQ 2000 con 40 µl di SLS e 0.5 µl di marker 600 (Beckman).

L'analisi dei frammenti ottenuti è fatta con in programma Fragment Analysis CEQ Beckman.

STUDI FUNZIONALI

Per lo studio della variante allelica al nt. 2721 si è utilizzato un sistema di espressione in vitro usando le cellule COS-1 ed il vettore d'espressione pCMV4. Le cellule COS-1 sono fibroblasti che derivano dalla linea cellulare CV-1 trasformati con un mutante di replicazione difettivo del virus SV40. La linea CV-1 origina dal rene di scimmia (African green).

Tali cellule producono costitutivamente l'antigene T del virus SV40 e permettono, se trasfettate con vettori che contengono l'origine di replicazione di SV40, come pCMV4, la replicazione ad alto numero di copie del vettore.

Le cellule sono mantenute in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO), implementato con il 10% di FBS (fetal bovine serum, GIBCO, Invitrogen), 2% Pest (Penicillina/Steptomycin), a 37°C, 5% CO₂.

PREPARAZIONE VETTORI

Per il clonaggio sono stati utilizzati due diversi vettori, pALTER-1 e pCMV4. pALTER-1 (Promega), (figura 14), è un vettore procariotico composto di 5680 nucleotidi e può incorporare inserti di dimensioni fino a 6 kilobasi. Il sito di clonaggio, che contiene numerosi siti unici di restrizione, è fiancheggiato dai promotori polimerasici SP6 e T7, sistemati con orientamento opposto. Il cDNA del gene *CYP21* (comprendente anche 29 basi del 3'UTR) è stato clonato tra i siti HindIII e KpnI, generando quindi il vettore pALTER-WT. Il vettore contiene i geni per la resistenza alla tetraciclina e alla penicillina, quest'ultimo porta una mutazione frameshift di un nucleotide che lo rende inattivo. Questo vettore è stato utilizzato nel sistema di mutagenesi (Altered Sites® II *in vitro* Mutagenesis System, Promega) per inserire la variante 2721 nel cDNA del gene *CYP21*.

Il cDNA mutagenizzato e quello wt sono stati poi inseriti nel nuovo vettore pCMV4 tramite digestione enzimatica (BglII e KpnI), purificazione da gel della banda corrispondente e reazione di ligasi tra cDNA e nuovo vettore digerito con gli stessi enzimi.

pCMV4 (figura 14) è un vettore d'espressione per cellule eucariotiche in cui il cDNA del gene *CYP21* si viene a localizzare a valle della regione promotrice immediata precoce del citomegalovirus umano (CMV), che avendo attività di promotore molto forte permette un'elevata efficienza di trascrizione (Tiina-Andersson 1989). Un elevato numero di copie dopo la trasfezione è inoltre assicurato dall'origine di replicazione oriSV40 contenuta del vettore che è

attivata dall'antigene T di SV40 prodotto dalle cellule COS-1. Il vettore, di 4.9 Kb, contiene anche un'origine di replicazione di batteriofago (f1), un enhancer di traduzione virale (A), un segnale di terminazione di trascrizione e sito di poliadenilazione del gene umano per l'ormone della crescita (hGH) ed un gene per la resistenza all'ampicillina.

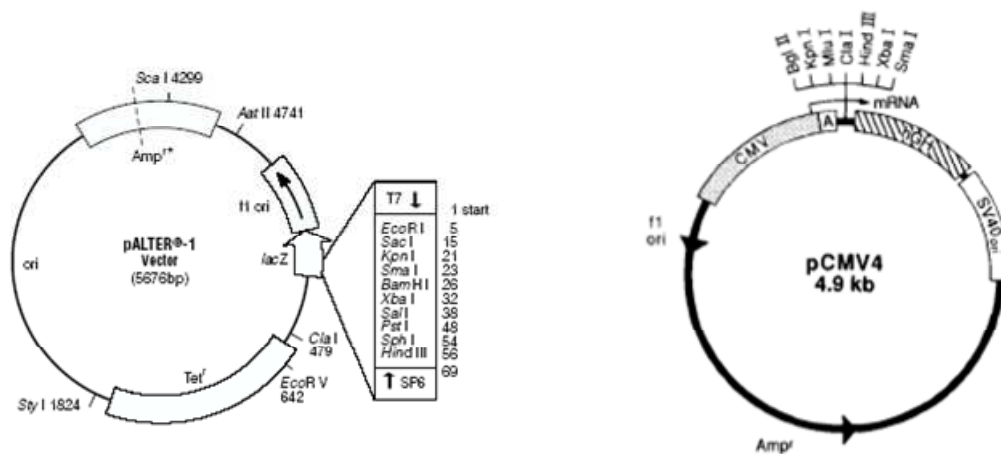


Figura 14. Schema dei vettori pALTER e pCMV4.

TRASFEZIONE

Le cellule COS-1 sono state piastrate alla concentrazione di 115×10^3 in piastre del diametro di 35 mm.

Dopo 24 ore è stato cambiato il terreno di coltura e le cellule sono state co-transfettate con 0.3 μ g di pCMV4 wt o mutato e 0.15 μ g di pCMV4 AR seguendo il seguente protocollo.

Per una piastra da 6 pozzetti (6 wellplate): 650 μ l di terreno -/- (senza antibiotico e senza FBS) + 20 μ l di Fugene (Roche) 5 min di incubazione a TA.

109 μ l di tale mix sono stati addizionati ai vettori e poi si è incubato il tutto per 15 min a TA; dopodichè è stato aggiunto goccia a goccia al terreno cellulare.

ESTRAZIONE RNA TOTALE

L'estrazione è stata fatta usando il kit commerciale Rneasy Mini Kit (Quiagen).

Dopo lavaggio con PBS delle piastre di coltura, sono stati addizionati 350 μ l di buffer RLT (Quiagen) addizionato con β -mercaptoetanololo (10 μ l/ml). Il lisato cellulare è stato raccolto e omogenato con una siringa da 1 ml con ago di 0.7 mm e posto immediatamente in ghiaccio secco.

Se non si procedeva immediatamente all'estrazione, il lisato veniva conservato a - 80 °C.

L'estrazione è stata fatta seguendo il protocollo per estrazione su colonna da cellule animali con eluizione finale in 42 μ l di H₂O Rnase free per due volte.

Si è proceduto poi immediatamente con la digestione del DNA utilizzando il kit abbinato Rnase-Free Dnase Set (Quiagen) seguito da ripurificazione su colonna con eluizione finale in 40 μ l di H₂O RNAsi free e poi ripassata sul filtro.

Ogni campione è stato corso su gel e quantificato al Nanodrop.

RETROTRASCRIZIONE

Per la sintesi del primo filamento del cDNA si è usato il kit First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham).

Si è scelto di utilizzare il primer oligo dT al posto del random primer per ottenere solo gli RNA messaggeri.

500 ng di RNA totale sono stati portati a volume di 8 µl con acqua DEPC e vengono incubati a 65°C per 10 minuti. Si aggiungono poi ad ogni campione: 5 µl di Bulk first-strand cDNA reaction mix, 1 µl di DTT e 1 µl di primer oligo dT 0.2 µg/ µl. Segue una incubazione di 1 ora a 37 °C.

I cDNA così ottenuti sono stati diluiti 1:30 e conservati a -20°C

REAL-TIME PCR

La quantificazione del messaggero è stata fatta sia per il gene *CYP21A2* (306-F: ACC TTG GGC TGC AAG ATG T; 472R: TTT CCA GAG CAG GGA GTA GTC T) che per il gene del recettore degli androgeni (AR) con cui era stata fatta la co-trasfezione. Ciò ha consentito in fase di elaborazione dei dati di normalizzare i valori ottenuti eliminando la variabile della diversa efficienza di trasfezione.

Gli standard interni sono ottenuti mescolando una ugual quantità di ogni cDNA e poi facendo diluizioni successive (toto, 1:5, 1:25).

La PCR quantitativa è stata fatta usando il fluoroforo Sybergreen (Biorad) su strumento Opticon 2 Real-Time PCR Detection System (Biorad)

La mix di reazione è la seguente:

cDNA	3 µl
primer F (3 µM)	2 µl
primer R (3 µM)	2 µl
SyberGreen	10 µl
H ₂ O Rnase free	3 µl
TOTALE	20 µl

Il ciclo di amplificazione è il seguente:

95°C x 10'	} X 45 cicli
94 °C x 10"	
61 °C x 10"	
72 °C x 15"	
78 °C x 1"	

I valori di Ct e le curve di melting sono state valutate utilizzando il software iCycler.

WESTERN BLOT

Dopo avere eliminato il terreno di coltura e lavato le cellule per due volte con PBS, sono state prelevate le cellule con lo scraper direttamente dalla piastra aggiungendo l'inibitore delle proteasi Complete (Roche). Il lisato è stato centrifugato a 2.000 rpm a 4°C per 5 minuti e eliminato il surnatante. Il pellet dopo essere stato risospeso in 100 µl di buffer Complete è stato sonificato per 10 secondi. La concentrazione di proteine nel surnatante è stata determinata allo spettrofotometro con il metodo Bradford (Roche) ed è stata valutata l'assorbanza a 590 nm. Una stessa quantità di proteine per ogni campione è stata caricata in un gel di SDS-acrilammide al 10% (SDS-PAGE gel, Invitrogen) nella camera elettroforetica XCell II Mimi-Cell (NOVEX, Invitrogen) dopo corsa secondo le istruzioni del manuale in running buffer MOPS, le proteine così separate sono state trasferite su membrana di cellulosa (Hybond ECL, Amersham Biosciences) utilizzando sempre la camera XCell II Mimi-Cell e il XCell II Blot Module secondo le istruzioni del manuale. Dopo il trasferimento, le membrane sono state lavate nel buffer TBS (5 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 7.6) addizionato di Tween 20 (buffer TBS-T). Per verificare il trasferimento delle proteine le membrane sono state colorate con Ponceau S Solution (Sigma-Aldrich) per 5 minuti e lavate brevemente con acqua deionizzata. L'immagine è stata acquisita al computer con il programma Phoshope e UMAX Vistascan attraverso uno scanner.

Dopo incubazione delle membrane per due ore in buffer TBS-T addizionato di latte in polvere al 10% (TBS-T-m), per bloccare i siti aspecifici, si è fatta

un'incubazione a +4°C overnight con l'anticorpo primario diluito in buffer TBS-T-m. L' anticorpo usato è policlonale ottenuto da coniglio immunizzato con un peptide sintetico corrispondente agli amminoacidi della proteina umana CYP21 (Lajic S et al, 2001) diluito 1:2000. Il giorno successivo le membrane sono state lavate con il buffer TBS-T 5 volte per 10 minuti in agitazione orbitale, incubate per 30 minuti nel buffer TBS-T-m, e incubate con l'anticorpo secondario, diluito 1:1500 in TBS-T-m per due ore. L' anticorpo secondario utilizzato è anti IgG di coniglio coniugato con l'enzima perossidasi di rafano (Santa-Cruz Biotechnology).

Per visualizzare le bande proteiche si aggiunge un substrato che se convertito dalla perossidasi emette chemiluminescenza (ECL) che viene acquisita mediante l'utilizzo di una CCD camera e un analizzatore d'immagini (Image Reader LAS-1000, Fuji film).

RISULTATI

Presso il Laboratorio di Genetica Molecolare dell'U.O. della Pediatria del S. Orsola si è iniziato a svolgere l'analisi molecolare del gene CYP21 dal 1995. La rapida evoluzione sia delle tecniche che delle conoscenze relative al gene CYP21 avuta negli ultimi anni, ha portato a ritenere necessario rivedere i risultati molecolari ottenuti prima del 2000 anche in previsione di una possibile diagnosi prenatale riguardante le famiglie in questione.

La prima parte del lavoro è consistita quindi nel rivalutare i pazienti che erano stati analizzati nel quinquennio 1995-2000, nei quali alcuni tratti del gene non erano stati sequenziati, oppure erano state cercate solo le mutazioni causative più frequenti con tecniche diverse (ASO, allele specific PCR, digestione enzimatica, ecc.). Tale lavoro ha portato alla risoluzione di alcuni casi nei quali non era stata trovata la seconda mutazione o, pur avendo individuato le due mutazioni nei due alleli, la correlazione genotipo-fenotipo non era buona. Sono stati inoltre individuati casi di falsi positivi e negativi dovuti alla minor accuratezza delle tecniche utilizzate in precedenza.

Parallelamente sono state sviluppate altre metodiche di supporto da utilizzare in casi particolari (vedi sezione metodi).

Per quanto riguarda CP2P2, si è verificato che circa il 20-30% dei soggetti omozigoti nella regione CD presentavano i nt di derivazione pseudogenica. In un 10% di questi o non era stata vista una mutazione sul frammento CD oppure si era vista una mutazione falsamente omozigote in quanto si era analizzato un solo allele. Il caso più emblematico è quello della apparente omozigosi I2, che invece si è dimostrata essere una eterozigosi composta I2/I172N. Tale tecnica ha perciò contribuito in modo evidente al miglioramento della correlazione genotipo/fenotipo.

La verifica della presenza di un gene chimerico nei soggetti completamente omozigoti ha dato esito positivo nel 40% dei casi confermando la presenza di un gene di fusione.

Per la verifica della segregazione allelica è stata messa a punto l'analisi di 4 microsatelliti prossimali al gene CYP21. Tale tecnica è stata usata in circa 20 famiglie per verificare i casi di segregazione dubbia e nei casi di diagnosi prenatale da villi coriali consentendo una rapida conferma degli alleli presenti nel feto.

Tutti i dati provenienti dai pazienti rivalutati e da tutti i pazienti analizzati per il gene CYP21A2 dal 1995 al 2006 presso il laboratorio sono stati archiviati in un database elettronico di rapido accesso. Si tratta di una tabella in formato excel in cui sono stati inseriti: nome del paziente, numero di DNA, provenienza, data e numero del referto, mutazioni, polimorfismi frequenti, varianti nucleotidiche rare e dosaggio ormonale basale e dopo stimolo ove noto (dati non mostrati).

Ne è risultato che i pazienti analizzati dal laboratorio dal 1995 al 2006 sono 285 di cui: 138 presentavano una forma classica (SW o SV), 131 presentavano una forma non classica (NC) ben caratterizzata, 16 avevano un fenotipo o un dosaggio ormonale borderline tra NC e eterozigote semplice.

Inoltre sono stati analizzati a vario titolo (segni di iperandrogenismo, tra cui pubarca precoce e irsutismo, incidentaloma surrenalico) circa 236 soggetti, più 24 parenti o partner di soggetti affetti.

I soggetti con fenotipo classico sono risultati nel 19% dei casi omozigoti, nel 69% emizigoti, nel 52% eterozigoti composti.

Le mutazioni con frequenza maggiore all'1 % trovate nel totale degli alleli analizzati sono raffigurate nel grafico 1. Le più comuni risultano essere: I2, delezione e I172N.

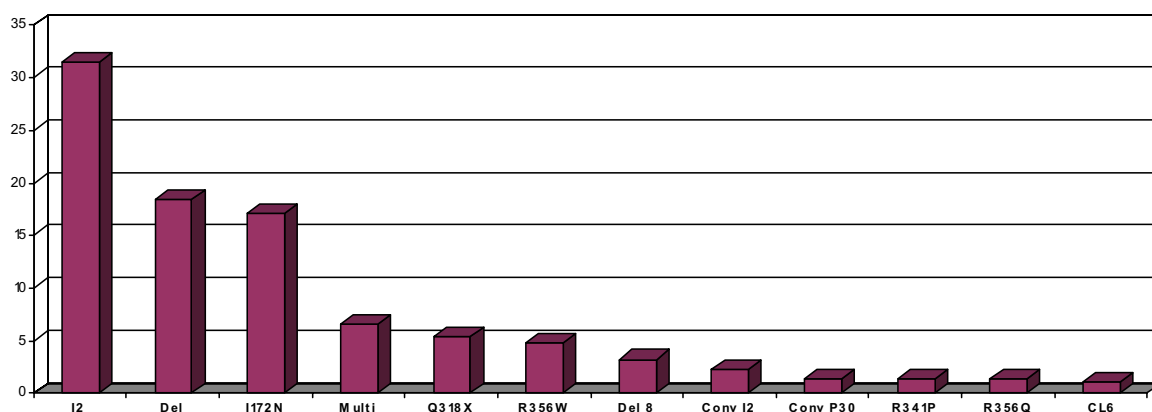


Grafico 1: Distribuzione delle mutazioni con frequenza > all'1% negli alleli dei pazienti con forma classica.

I soggetti con fenotipo non classico sono risultati nel 15% dei casi omozigoti, nel 16% emizigoti, nel 69% eterozigoti composti e la mutazione di gran lunga più frequente è risultata essere la V281L (48%). Come si vede dal grafico 2 c'è anche una certa frequenza di mutazioni gravi ma ricordiamo che il fenotipo è determinato dall'allele con la mutazione più lieve.

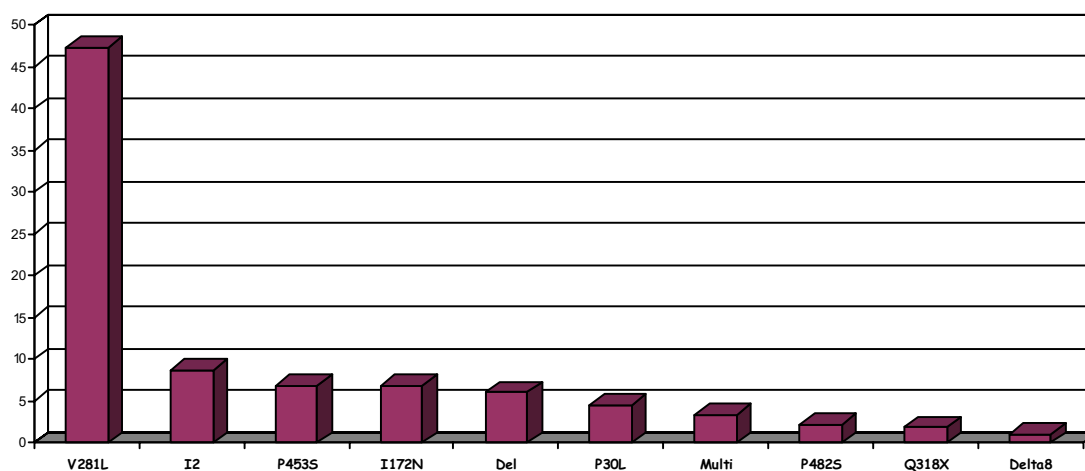


Grafico 2: Distribuzione in valore percentuale delle mutazioni negli alleli dei pazienti con forma non classica

Gli alleli analizzati sono stati più di 1000: oltre alle mutazioni già citate, ne sono state individuate inoltre molte altre con una frequenza minore: alcune

sono ben note e fanno parte delle 10 mutazioni comunemente cercate come la CL6 e la InsT, altre sono molto rare, ma descritte in almeno un altro caso (Tab. 10).

Mutazione	Fenotipo
Conv. fino I2	CL
Conv. fino P30	CL
Ins.T	CL
CL6	CL
R356Q	CL
G178R	CL
W19X	CL
R316X	CL
R426H	CL
R483P	NC

Tabella 10 Mutazioni con frequenza minore all'1% trovate nei nostri pazienti e relativo fenotipo associato.

Sono state inoltre individuate 10 mutazioni non descritte in letteratura, per cui nuove, mostrate in figura 15. Di queste mutazioni, due sono state valutate tramite studi funzionali in vitro (Barbaro M et al, 2006): I171N e L446P.

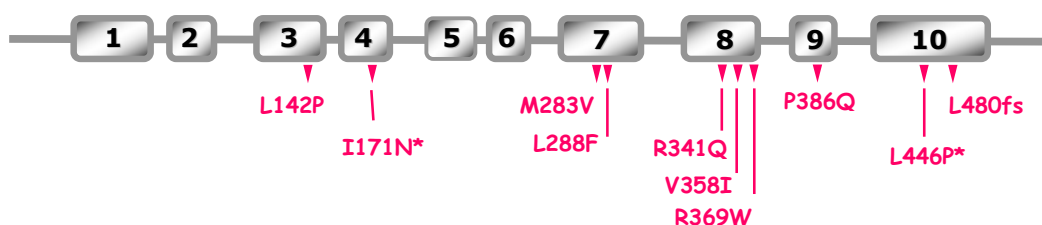


Figura 15. Localizzazione, nel gene CYP21, delle 10 mutazioni nuove identificate. * Barbaro M et al, 2006.

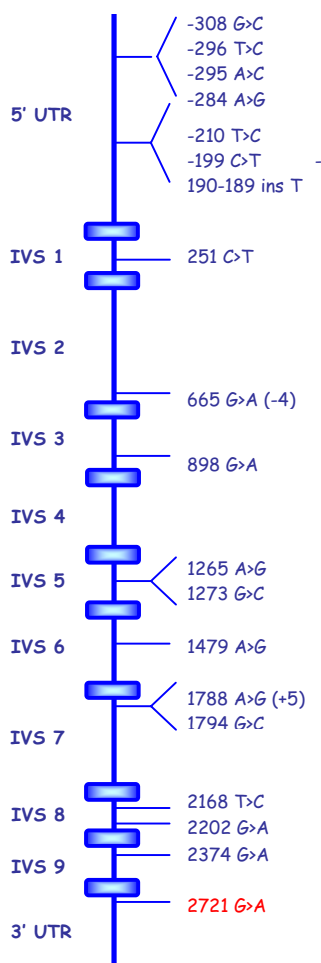


Figura 16. Varianti nucleotidiche trovate nelle regioni non codificanti del gene CYP21A2

Il database ha permesso di valutare inoltre tutte le varianti nucleotidiche individuate nelle regioni non codificanti. In figura 16 sono riportate le 19 sostituzioni che sono state riconfermate da un nuovo amplificato.

Alcune sono risultate essere semplici polimorfismi, altre sono ancora troppo poco rappresentate per poter essere valutate o si trovano associate con altre mutazioni su uno stesso allele.

VALUTAZIONE VARIANTE NT 2721

Dalla valutazione dei dati inseriti in tabella è emerso che un certo numero di casi riferiti come fenotipo non classico lieve risultavano avere una variante nella regione 3' UTR del gene: Tale variante è causata da una sostituzione nucleotidica G>A a +13 dal codone di stop TGA a livello del nucleotide 2721 (Fig. 17).

Tale sostituzione è stata verificata su amplificati diversi e su entrambi i filamenti.

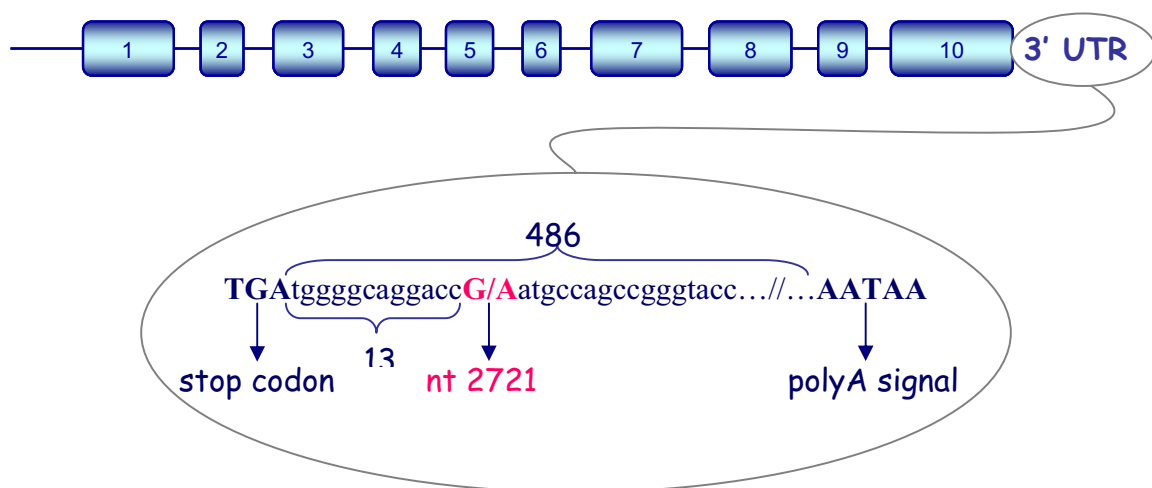


Figura 17. Rappresentazione schematica della regione 3' UTR dallo stop codon al segnale di poliadenilazione. In rosso: sostituzione nucleotidica 2721.

E' stata identificata in 8 pazienti (dati clinici disponibili solo per 7 pazienti) e 3 padri che risultano tutti eterozigoti composti (Tab. 11), quindi presentano un'altra mutazione sul secondo allele, e in 6 eterozigoti semplici dei quali non vengono mostrati i dati.

L'analisi sui campioni disponibili dei genitori ha permesso di verificare che tale sostituzione era l'unica variante presente su un allele.

Pz	Allele 1	Allele 2
A.M.*	2721 G>A	V281L
B.D.	2721 G>A	I2+V281L
B.S.	2721 G>A	I172N + V358I
D.E.	2721 G>A	I172N
Padre di D.E.	2721 G>A	I2
F.C.	2721 G>A	I172N + CL6
Padre di F.C.	2721 G>A	V281L
M.A.	2721 G>A	I2
G.M.	2721 G>A	I2
Padre di G.M.	2721 G>A	R356Q

Tabella 11. Alterazioni trovate sui due alleli. * dati clinici non disponibili.

In 6 casi erano disponibili i campioni di entrambi i genitori permettendo la verifica della segregazione della mutazione utilizzando l'analisi di microsatelliti prossimali al gene: TNF- α , D6S273, LH-1 e TAP-1 (Tab. 12).

Il dato più evidente è che il microsatellite D6S273 è uguale in tutti gli alleli portatori della variante G>A al nt 2721.

Pz	TNF- α	D6S273	LH-1	TAP-1
A.M.	116/100	134 /130	87/74	270/272
B.D.	100/116	134 /130	87/74	272/270
B.S.	100/108	134 /130	-	270/272
D.E.	118/116	134 /132	100/85	-
F.C.	100/122	134 /132	87/85	272/270
G.M.	100/116	134 /134	87/87	272/272

Tabella 12. risultati dei 4 microsatelliti analizzati. Il valore si riferisce alla posizione del picco e non al numero di ripetizioni.

La verifica dei polimorfismi intragenici mostra le stesse varianti all'eliche suggerendo che l'allele sia sempre lo stesso.

Il sequenziamento del gene in questi pazienti è stato prolungato fino a 600 paia di basi oltre lo stop codon per verificare tutto il 3'UTR fino al segnale di poliadenilazione.

Per verificare in vitro l'effetto della sostituzione G>A al nucleotide 2721, è stato costruito un costrutto nel vettore pCMV4 costituito dal cDNA del gene CYP21 comprendente 29 nucleotidi del 3'UTR con la sostituzione di interesse.

I vettori pCMV4-CYP21wt o pCMV4-CYP21mut sono stati cotrasfettati con il vettore pCMV4-ARwt (contenente il cDNA del gene per il recettore degli androgeni) in cellule eucariotiche COS-1 e ed è stato raccolto l'RNA totale

inizialmente a tempi diversi e poi l'esperimento è stato ripetuto 6 volte alle 24 ore, tempo di massima espressione, in modo indipendente utilizzando 3 cloni diversi.

Tramite RT-PCR quantitativa è stato valutato il livello di mRNA del gene *CYP21* (corretto per il gene *AR*) nel wilde-type e nel mutante. Come mostrato nel grafico 3 il livello medio del messaggero del mutante è circa il 70% rispetto al wilde-type.

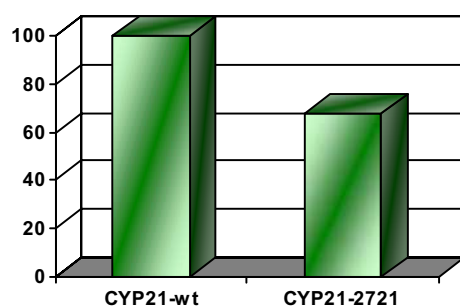


Grafico 3. Valore medio percentuale del livello di mRNA di *CYP21* con la sostituzione 2721 G>A (a destra) rispetto al wilde-type (a sinistra) fissato arbitrariamente al 100%.

Successivamente è stata valutata la quantità di proteina prodotta con Westernblot utilizzando lo stesso sistema di espressione in vitro e raccogliendo le proteine dopo 48 ore dalla trasfezione.

Il western blot è stato effettuato utilizzando prime un anticorpo per rilevare la proteina *CYP21* e poi, sullo stesso filtro con anticorpo per rilevare la proteina *AR*. Come mostrato in figura 18, la banda corrispondente a *CYP21*-2721A risulta avere una intensità minore rispetto a *CYP21*-wt mentre per l'*AR* la situazione risulta contraria; ciò conferma che il dato non è alterato per esempio da una minore quantità di partenza nel mutante. Tale risultato è stato confermato successivamente per due volte. Si ritiene pertanto che il gene

CYP21 con la sostituzione *G>A* al nt 2721 dia origine a meno proteina rispetto al normale gene CYP21.

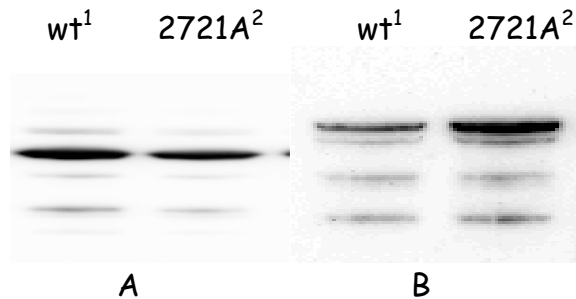


Figura 18. Western blot: A marcatura per CYP21; B marcatura per AR; ¹ proteine ricavate dalla co-trasfezione CYP21-wt (2721G) e AR-wt; ² proteine ricavate dalla co-trasfezione CYP21-2721A e AR-wt.

Come suggerito da Chen (Chen JM et al, 2006) si è utilizzato il programma di predizione *mfold* (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/rna/form1.cgi>) per la predizione della struttura secondaria dell' RNA allo scopo di valutare una possibile modificazione della struttura del 3'UTR dovuta alla sostituzione 2721 *G>A*. Utilizzando i parametri standard e sottoponendo all'analisi 100 basi prima e 100 basi dopo la sostituzione, si nota un cambiamento di struttura con la formazione di un loop di notevoli dimensioni con diminuzione della stabilità interna (dG). (Fig. 19).

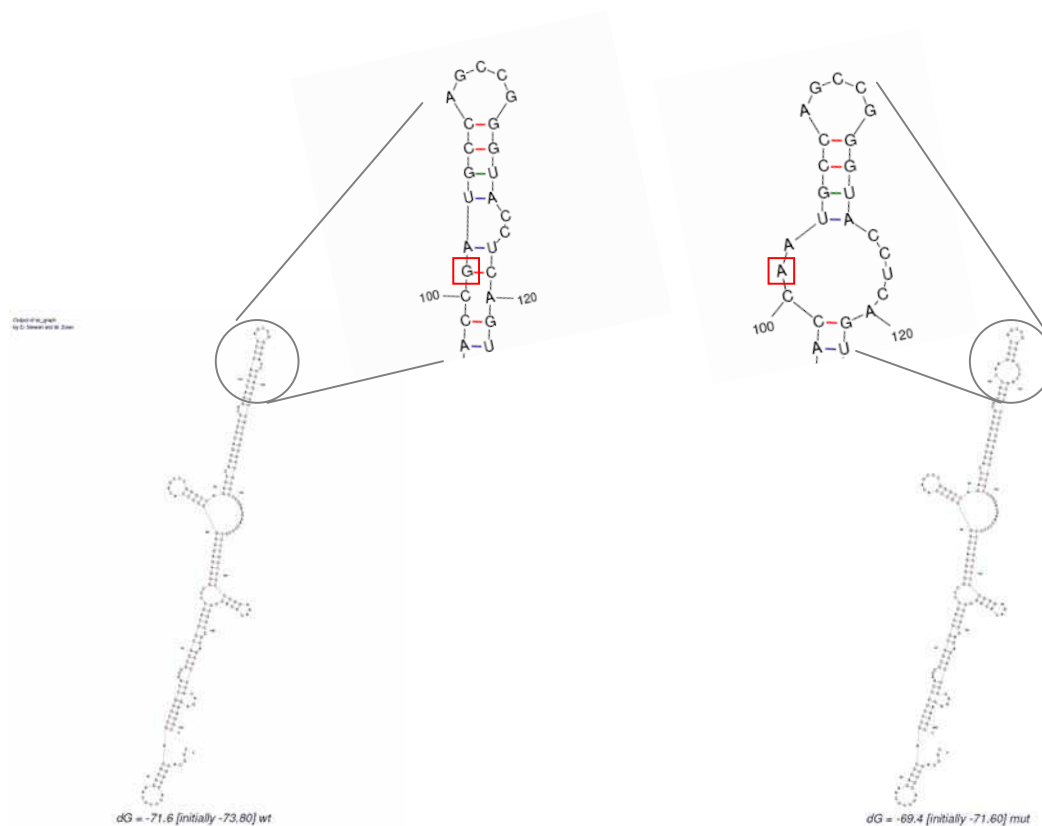


Figura 19. Predizione della struttura secondaria dell'mRNA utilizzando il programma *mfold*. A sinistra struttura del wilde-type a destra struttura con sostituzione 2721 identificata dal quadrato rosso.

Utilizzando parametri diversi (lunghezza frammento, temperatura, stabilità) si osserva comunque una variazione di struttura (dati non mostrati).

CYP11B1

Al fine di migliorare la diagnosi molecolare nei pazienti affetti da iperplasia surrenale congenita, si è messa a punto l'analisi molecolare del gene *CYP11B1* responsabile del deficit di 11 β -idrossilasi. La metodica è basata su PCR e sequenziamento diretto di tutti gli esoni, delle regioni fiancheggianti; punto chiave è stato il disegno di primer di amplificazione specifici, disegnati nei punti di massima diversità tra *CYP11B1* e *CYP11B2* per discriminare i due geni altamente omologhi. Dopo aver verificato su campioni di controllo la specificità

(CYP11B1 vs CYP11B2) della metodica messa a punto, il gene CYP11B1 è stato analizzato in 5 pazienti candidati per il deficit di 11 β -idrossilasi.

Nei pazienti G.M. non sono state trovate mutazioni nelle regioni analizzate; B.L. è risultato eterozigote semplice per la mutazione nota L299P nell'esone 5; F.G. è eterozigote composto per le mutazioni note A306V di origine materna e Q356X di origine paterna rispettivamente nell'esone 5 e 6.

B.R. e P.A. sono risultati eterozigoti composti per una mutazione nota e una nuova.

B.R. (fig. 20a) presenta sull'allele materno la mutazione L299P e sul paterno la variazione E310L mai descritta in letteratura. La sostituzione Glu-Leu è causata dalla sostituzione G>A al nucleotide 3554 (rif. +1 A del codone iniziale ATG) che varia la tripletta da GAA (Glu) ad AAA (Leu). Entrambe le mutazioni di questo paziente sono localizzate nell'esone 5.

P.A. (fig. 20b) presenta la L299P paterna e la sostituzione R332Q sull'allele materno. Questa ultima nuova sostituzione è causata dalla variazione G>A al nucleotide 3984 localizzato nel sesto esone.

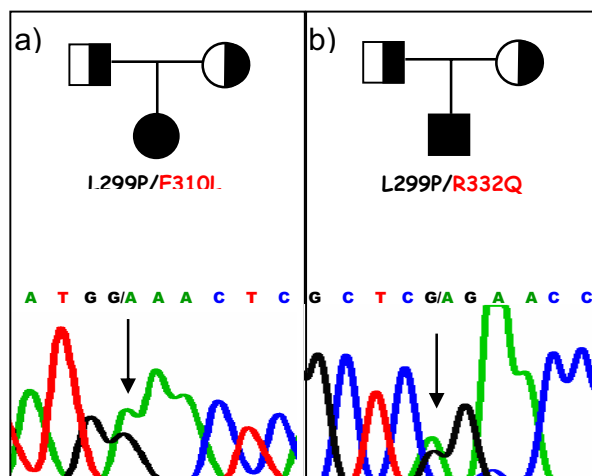


Figura 20. Albero genealogico ed elettroferogramma dei due pazienti, B.R. a) e P.A. b), con mutazione nuova.

Sia le due mutazioni nuove che le altre note trovate nei nostri pazienti sono localizzate negli esoni 5 e 6 come mostrato in figura 21.

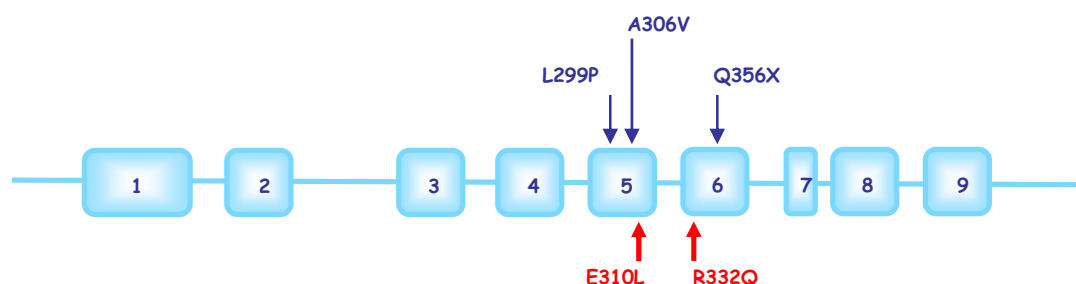


Figura 21. Localizzazione schematica della posizione delle mutazioni identificate nel gene CYP11B1.

Con il programma *C/usta/ W* sono state allineate le sequenze proteiche note di varie specie per verificare la conservazione dei due residui (E310 e R332) in cui sono state identificate le due mutazioni nuove (Fig. 22). Ne risulta che in posizione 310 in alcune specie si trova un acido aspartico (D) al posto dell'acido glutammico (E) ma mai una leucina (L); invece il residuo 332 è perfettamente conservato in tutte le specie.

Homo	DAIKANSME	LTAGSV	DTTVF	PLLMT	LFELAR	NPNVQ	QALRQ	ESLAAA
papio	DAIKANSME	LTAGSV	DTTVF	PLLMT	LFELAR	NPNVQ	QALRQ	ESLAAA
Ovis	DTIKANTID	LTAGSV	DTTAF	PLLMT	LFELAR	NPEVQ	QALRQ	ESLVAE
ovis	DTIKANTID	LTAGSV	DTTAF	PLLMT	LFELAR	NPEVQ	QALRQ	ESLVAE
Bos	DTIKANTID	LTAGSV	DTTAF	PLLMT	LFELAR	NPEVQ	QAVRQ	ESLVAE
Rattus	DAIHANSME	LIAGSV	DTTAS	LVMTL	LFELAR	NPVQ	QALRQ	ESLAAE
mus	DAIQANSME	LIAGST	DTTST	PLVMT	FFELAR	NPVQ	QALRQ	ESLAAE
cavia	RAMKANIM	LVAGSV	DTTAL	PLMMT	LFELAR	NPTVQ	QALRQ	ESMATE
Xenopus	DSIKANVTE	LMAGGV	DTTAM	PLLFT	LFELAR	NPITS	-----	-----
Dicentrarchus	DLIKANITE	LMAGGV	DTTAV	PLQF	LFELAR	NPIT	-----	-----

Figura 22. Allineamento di un tratto della sequenza proteica di 11 β -idrossilasi in specie diverse. In verde è evidenziata la 310, in giallo la R332.

Sono state osservate inoltre due sostituzioni nucleotidiche, già descritte in letteratura, che non portano a cambio di aminoacido, A/G e C/T rispettivamente nell'esone 1 e 2 a livello della Leu 75 e della Asp 82. Numerose varianti nucleotidiche (descritte/non descritte) sono state individuate nelle regioni introniche analizzate, la cui frequenza nei 12 alleli analizzati è riportata in tabella 13.

Nucleotide	Frequenza
1070 G/C	3/12
2296 T/C	2/12
2326 T/C	2/12
2810 G/A	7/12
3258 T/G	7/12
3279 C/T	7/12
3351 T/G	6/12
3719 T/A	1/12
3832 T/G	6/12
4429 T/G	5/12

Tabella 13. Variazioni nucleotidiche identificate nelle regioni non codificanti e relativa frequenza nei 12 alleli analizzati.

DISCUSSIONE

L'iperplasia surrenale congenita (CAH) rappresenta la prima causa di pseudoermafroditismo femminile; è causata principalmente (90-95%) da deficit di 21-idrossilasi e in misura molto minore (5-8%) dal deficit di 11-idrossilasi. La buona correlazione genotipo-fenotipo e la possibilità di terapia in utero in grado di prevenire la virilizzazione fanno della diagnosi molecolare di questa patologia uno step diagnostico importante.

Nel 1995 si è iniziata l'analisi molecolare del gene *CYP21* presso il Laboratorio di Genetica Molecolare, afferente al servizio di Endocrinologia Pediatrica del S. Orsola di Bologna. I pazienti analizzati provengono sia dal nostro centro che da altri centri nazionali.

I metodi e la procedura di indagine hanno avuto una continua evoluzione durante questi 10 anni ed in particolare la decisione di sequenziare il gene per intero ha reso ancora più evidenti i problemi diagnostici legati alla genetica complessa del locus in questione.

Si è ritenuto pertanto necessario rivalutare i pazienti analizzati nel quinquennio 1995-2000 completando il sequenziamento ed applicando, ove richiesto, le nuove metodiche messe a punto.

Questo ri-esame ha permesso di risolvere analisi incomplete o errate (falsi positivi o negativi) migliorando in modo significativo la correlazione genotipo-fenotipo.

L'applicazione di nuove metodiche per l'individuazione di fenomeni di allele-dropout ha portato ad aumentare la caratterizzazione degli alleli dal 92,7% al 98,8%. In particolare la verifica della perdita di un allele nel frammento CD e la verifica della presenza di un gene chimerico nei pazienti omozigoti hanno permesso di aumentare il numero di alleli caratterizzati.

L'allestimento di un database elettronico che raccoglie tutti i dati molecolari dei pazienti (mutazioni, polimorfismi, varianti alleliche rare) ha permesso di avere un quadro generale del lavoro svolto e dei risultati ottenuti.

Dall'analisi di più di 1000 alleli sono emersi alcuni aspetti importanti:

- alcune delle 10 mutazioni che vengono solitamente ricercate con metodi rapidi hanno in realtà una frequenza minore all' 1% pertanto comparabile alle mutazioni rare, pertanto non ha senso inserirle negli screening rapidi delle mutazioni frequenti
- il 6.5% degli alleli nelle forme classiche e il 3.5% nelle forme non classiche sono multipli, cioè caratterizzati dalla presenza di 2 o più mutazioni, con importanti implicazioni per la consulenza genetica

Ciò sottolinea il fatto che limitarsi alla ricerca delle mutazioni cosiddette "frequenti" nel gene *CYP21A2* può comportare una grossa percentuale di errore data l'ampiezza dello spettro di mutazioni da valutare. Alla luce di queste considerazioni, quindi, il sequenziamento dell'intero gene assume un' importanza particolare nella diagnosi di deficit di 21-idrossilasi.

L'identificazione di nuove mutazioni, inoltre, porta nuovi contributi alla identificazione di residui/microdominii importanti per la struttura/funzione proteica: dato tanto più importante fino a che non si conoscerà l'esatta struttura 3D.

Tra le varianti identificate nelle regioni non codificanti è risultata di particolare interesse una sostituzione nucleotidica localizzata nel 3'UTR. Si tratta di una transizione *G>A* a 13 basi dallo stop codon a livello del nucleotide 2721. Tale sostituzione è stata trovata in 8 pazienti eterozigoti composti e 3 genitori anch'essi eterozigoti composti. Dal punto di vista clinico, i pazienti che presentavano solo questa variante su un allele, manifestano prevalentemente

segni di pubertà precoce ed età ossea avanzata. I valori ormonali di 17-OHP sia basali che dopo stimolo con ACTH risultano moderatamente elevati. Sia la valutazione dei polimorfismi intragenici che l'analisi dei microsatelliti lasciano supporre che l'aplotipo sia identico. La struttura secondaria del messaggero è stata valutata tramite il programma *mfold*: la sostituzione G>A 2721 causa una variazione di struttura, con conseguente diminuzione della stabilità interna, mostrando la formazione di un loop di notevoli dimensioni. Questa alterazione strutturale potrebbe causare dei problemi di interazione con fattori di regolazione/degradazione che interagiscono con l'RNA. Con lo stesso programma e gli stessi parametri, il gruppo di Chen (Chen JM et al, 2006) ha rivalutato più di 80 alterazioni descritte nella regione 3'UTR dimostrando una elevata attendibilità. Dagli studi *in vitro* condotti su questa alterazione risulta evidente che il livello di proteina mutata è minore rispetto al normale. Ciò è stato verificato sia con un metodo quantitativo sull'RNA messaggero sia a livello proteico con Westernblot. La sostituzione sembra causare una diminuzione del livello dell'enzima di circa un 30%, ben correlabile con il quadro fenotipico lieve dei pazienti.

La messa a punto dell'analisi del gene CYP11B1 ha permesso di ampliare la risposta diagnostica molecolare nei casi di iperplasia surrenale congenita. Lo studio del gene in 5 soggetti candidati per il deficit di 11 β -idrossilasi ha portato all'identificazione di 3 soggetti eterozigoti composti, 1 eterozigote semplice per mutazioni nel gene CYP11B1.

Complessivamente sono state identificate tre mutazioni note e di due nuove, tutte localizzate negli esoni 5 e 6.

Le mutazioni L299P (Krone N et al, 2005), A306V (Curnow KM et al, 1993) e Q356X (Lee HH et al, 2005) sono già state descritte come causa di deficit di 11 β -idrossilasi. La nuova mutazione E310L coinvolge un residuo ben conservato e causa la sostituzione di un aminoacido carico negativamente con uno idrofobico. In base al modello tridimensionale proposto da Krone (Krone N et al, 2005) si localizza in una struttura ad elica, l'elica I, fondamentale per il riconoscimento ed il legame del substrato.

La R332Q anch'essa mai descritta, anche se non comporta un cambio particolarmente drastico (da aminoacido carico positivamente ad aminoacido polare), coinvolge però un residuo perfettamente conservato tra le specie. Si trova localizzata, come la E310, nella porzione proteica implicata nell'interazione col substrato.

Si ritiene pertanto che entrambe le mutazioni nuove alterino aminoacidi importanti per la funzionalità enzimatica e siano perciò implicate nei fenotipi osservati.

CONCLUSIONI

L'introduzione di nuove metodiche e strumentazioni ha portato a sviluppare un metodo di indagine sempre più accurato e specifico adatto alla genetica complessa di questa patologia. Ciò ha consentito di:

- aumentare la percentuale di "mutation detection" diminuendo drasticamente il numero di alleli non caratterizzati
- implementare la diagnosi anche prenatale
- ottimizzare la terapia soprattutto nei pazienti borderline
- affinare la correlazione genotipo-fenotipo
- trovare nuove mutazioni che portano un contributo alla comprensione del ruolo svolto da singoli residui nella struttura/funzione della proteina

Gli studi effettuati ci hanno portato a capire che ogni paziente rappresenta un caso particolare che necessita, dopo una prima valutazione standard, di tecniche e metodiche appropriate.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Alessandro Cicognani, direttore dell' Unità Operativa di Pediatria, per darmi l'opportunità di lavorare nel suo staff.

Ringrazio la D.ssa Lilia Baldazzi per la fiducia dimostrata nell'affidarmi questo lavoro e per l'immane aiuto e sostegno.

Ringrazio tutti i miei colleghi che hanno contribuito in vario modo a questo lavoro: Michela Barbaro, Lorella Barp, Alessandra Antelli, Annalisa Nicoletti, Giuseppe Cangemi, Maurizio Maccaferri.

Ringrazio il Dott. Antonio Balsamo che ha seguito tutti i pazienti e mi ha fornito i dati clinici creando un clima di grande collaborazione.

Ringrazio, infine, la Prof.ssa Anna Wedell per avermi ospitato nel suo gruppo e avermi dato l'opportunità di ampliare le mie conoscenze.

BIBLIOGRAFIA

Azziz R, Dewailly D, Owerbach D: Clinical review 56: Nonclassic adrenal hyperplasia: current concepts. *J Clin Endocrinol Metab* 78(4):810, 1994.

Balsamo A, Cacciari E, Piazzzi S, Cassio A, Bozza D, Pirazzoli P, Zappulla F: Congenital adrenal hyperplasia: neonatal mass screening compared with clinical diagnosis only in the Emilia-Romagna region of Italy, 1980-1995. *Pediatrics* 98(3 Pt 1):362, 1996.

Barbaro M, Baldazzi L, Balsamo A, Lajic S, Robins T, Barp L, Pirazzoli P, Cacciari E, Cicognani A, Wedell A: Functional studies of two novel and two rare mutations in the 21-hydroxylase gene. *J Mol Med*. 84(6):521-8, 2006.

Bornstein SR, Chrousos GP: Clinical review 104: Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *J Clin Endocrinol Metab* 84(5):1729, 1999.

Chen JM, Ferec C, Cooper DN: A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes II: the importance of mRNA secondary structure in assessing the functionality of 3' UTR variants. *Hum Genet* 120:301-333, 2006.

Chin KK, Chang SF: The -104G nucleotide of the human CYP21 gene is important for CYP21 transcription activity and protein interaction. *Nucleic Acids Res* 26(8):1959, 1998.

Curnow KM, Slutsker L, Vitek J, Cole T, Speiser PW, New MI, White PC, Pascoe L: Mutations in the CYP11B1 gene causing congenital adrenal hyperplasia and hypertension cluster in exons 6, 7, and 8. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4552-56, 1993.

Dangel AW, Mendoza AR, Baker BJ, Daniel CM, Carroll MC, Wu LC, Yu CY: The dichotomous size variation of human complement C4 genes is mediated by a novel family of endogenous retroviruses, which also establishes species-specific genomic patterns among Old World primates. *Immunogenetics* 40(6):425, 1994.

Day DJ, Speiser PW, Schulze E, Bettendorf M, Fitness J, Barany F, White PC: Identification of non-amplifying CYP21 genes when using PCR-based diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia (CAH) affected pedigrees. *Hum Mol Genet* 5:2039-48, 1996.

Forest MG, Nicolino M, Davia M and Morel Y: the virilized female: endocrine background. *BJU International* 93(suppl 3): 35-43, 2004.

Johnson EF, Wester MR, Stout CD: The structure of microsomal cytochrome P450 2C5: a steroid and drug metabolizing enzyme. *Endocr Res* 28(4):435, 2002.

Krone N, Riepe FG, Götzte D, Korsch E, Rister M, Commentz J: Congenital Adrenal Hyperplasia Due to 11-Hydroxylase Deficiency: Functional Characterization of Two Novel Point Mutations and a Three-Base Pair Deletion in the CYP11B1 Gene. 90(6):3724-3730, 2005.

- Lajic S, Robins T, Krone N, Schwarz HP, Wedell A: CYP21 mutations in simple virilizing congenital adrenal hyperplasia. *J Mol Med* 79(10):581, 2001.
- Lee HH: Diversity of the CYP21P-like gene in CYP21 deficiency. *DNA Cell Biol* 24(1):1, 2005.
- Lee HH, Won GS, Chao HT, Lee YJ, Chung BC: Novel missense mutations, GCC [Ala306]- > GTC [Val] and ACG [Thr318]- > CCG [Pro], in the CYP11B1 gene cause steroid 11beta-hydroxylase deficiency in the Chinese. *Clin. Endocr.* 62:418-22, 2005.
- Levine LS, Pang S: Prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Endocrinol* 7(3):193, 1994.
- Lewis DF, Lee-Robichaud P: Molecular modelling of steroidogenic cytochromes P450 from families CYP11, CYP17, CYP19 and CYP21 based on the CYP102 crystal structure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 66(4): 217-33, 1998.
- New MI: Inborn errors of adrenal steroidogenesis. *Mol Cell Endocr* 211: 75-83, 2003.
- Nordenstrom A, Marcus C, Axelson M, Wedell A, Ritzen EM: Failure of cortisone acetate treatment in congenital adrenal hyperplasia because of defective 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase reductase activity. *J Clin Endocrinol Metab* 84(4):1210, 1999.
- Nordenstrom A, Ahmed S, Jones J, Coleman M, Price DA, Clayton PE, Hall CM: Female preponderance in congenital adrenal hyperplasia due to CYP21 deficiency in England: implications for neonatal screening. *Horm Res* 63(1):22, 2005.
- Peter M, Dubuis JM, Sippell WG: Disorders of the Aldosterone Synthase and Steroid 11 β -Hydroxylase Deficiencies. *Horm Res* 51:211-222, 1999.
- Peterson JA, Sevrioukova I, Truan G, Graham-Lorence SE: P450BM-3; a tale of two domains-- or is it three? *Steroids* 62(1):117, 1997.
- Prader A: [Perfect male external genital development and salt-loss syndrome in girls with congenital adrenogenital syndrome.]. *Helv Paediatr Acta* 13(1):5, 1958.
- Rainey WE WP: Functional adrenal zonation and regulation of aldosterone biosynthesis. *Curr Opin Endocrinol Diab* 5:175-182, 1998.
- Robins T, Carlsson J, Sunnerhagen M, Wedell A, Persson B: Molecular model of human CYP21 based on mammalian CYP2C5: structural features correlate with clinical severity of mutations causing congenital adrenal hyperplasia. *20(11): 2946-64*, 2006.
- Rösler A, Leiberman E, Cohen T: High frequency of congenital adrenal hyperplasia (classic 11 β -hydroxylase deficiency) among jews from Morocco. *Am J Med Genet* 42:827-834, 1992.

Schoch GA, Yano JK, Wester MR, Griffin KJ, Stout CD, Johnson EF: Structure of human microsomal cytochrome P450 2C8. Evidence for a peripheral fatty acid binding site. *J Biol Chem* 279(10):9497, 2004.

Scott EE, He YA, Wester MR, White MA, Chin CC, Halpert JR, Johnson EF, Stout CD: An open conformation of mammalian cytochrome P450 2B4 at 1.6-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23):13196, 2003.

Speiser PW, New MI: Prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Endocrinol* 7(3):183, 1994.

White PC, Grossberger D, Onufer BJ, Chaplin DD, New MI, Dupont B, Strominger JL: Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(4):1089, 1985.

White PC, Curnow KM, Pascoe L: Disorders of steroid 11 beta-hydroxylase isozymes. 15(4): 421-38, 1994.

White PC, Speiser PW: Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 21(3):245, 2000.

Wijesuriya SD, Zhang G, Dardis A, Miller WL: Transcriptional regulatory elements of the human gene for cytochrome P450c21 (steroid 21-hydroxylase) lie within intron 35 of the linked C4B gene. *J Biol Chem* 274(53):38097, 1999.

Williams PA, Cosme J, Ward A, Angove HC, Matak Vinkovic D, Jhoti H: Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature* 424(6947):464, 2003.

Yang Z, Mendoza AR, Welch TR, Zipf WB, Yu CY: Modular variations of the human major histocompatibility complex class III genes for serine/threonine kinase RP, complement component C4, steroid 21-hydroxylase CYP21, and tenascin TNX (the RCCX module). A mechanism for gene deletions and disease associations. *J Biol Chem* 274(17):12147, 1999.

Yano JK, Wester MR, Schoch GA, Griffin KJ, Stout CD, Johnson EF: The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05 Å resolution. *J Biol Chem*, 2004.